

REPLICACIÓN Y ENSAMBLAJE DEL ARBOVIRUS Bunyamwera EN CÉLULAS DEL INSECTO VECTOR *Aedes albopictus*

Tesis Doctoral

**Noelia López Montero
Madrid, 2013**



U n i v e r s i d a d A u t ó n o m a d e M a d r i d

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por:

NOELIA LÓPEZ MONTERO

Directora de Tesis:

CRISTINA RISCO ORTIZ



CNB

CENTRO
NACIONAL DE
BIOTECNOLOGIA



Este trabajo de tesis ha sido realizado en el Laboratorio de Estructura Celular del Departamento de Estructura de Macromoléculas del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) con un contrato de personal investigador de apoyo concedido por la Comunidad de Madrid.

A ABRIL

Sin la ayuda profesional y personal de supervisores, compañeros, familia y amigos este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo...

En primer lugar quiero agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Cristina Risco, el haberme dado la oportunidad de desarrollar mi tesis doctoral en su laboratorio. Gracias por haber escuchado y valorado mis ideas, por haberme dado consejos y guía pero también independencia y confianza. Muchas gracias también por las rapidísimas correcciones contra reloj de este documento.

Gracias al Dr. Alberto Fraile-Ramos por ayudarme al inicio con las técnicas de biología molecular.

Una gran parte de los reactivos y virus recombinantes utilizados en este trabajo fueron cedidos por el Prof. Richard Elliott, sin ellos muchos de los experimentos no hubieran sido posibles. Durante mi estancia en su laboratorio del “Biomedical Sciences Research Complex” en la Universidad de Saint Andrews (Escocia) aprendí técnicas de biología molecular para la generación de virus recombinantes. Allí no sólo crecí en el plano profesional sino también en el personal. Sólo pasé dos meses en su laboratorio pero por su filosofía de trabajo, basada en la integración, respeto y confianza de todos sus miembros, me sentí como en casa. Gracias a él y a su gente.

Quería agradecer también a los servicios técnicos del CNB, en particular al Servicio de Microscopía Electrónica (Cristina Patiño y Javier Bueno) y al Servicio de Microscopía Confocal (Sylvia Gutiérrez) por su apoyo y consejos. En general, quiero dar las gracias a todos los compañeros y jefes de los laboratorios del Dpto. de Estructura de Macromoléculas situados en el edificio nuevo (antiguo laboratorio B-14) con los que he convivido estos años. Especialmente a Álvaro Peña, con quien compartí los primeros y excitantes momentos en el CNB, y a Jorge Cuellar.

A quien debo mucho es a mi compañera y profesora, Gloria Calderita. Te agradezco tu paciencia conmigo y el haberme transmitido un método metódico de trabajo que he tratado de seguir desde entonces. Gracias también por los buenos momentos vividos dentro y fuera del laboratorio, y por brindarme tu amistad.

Como no, también a mi compañero Juan Fontana por haberme dado consejo y apoyo siempre que lo he necesitado. Gracias también por esforzarte en mantener el contacto y la amistad aunque, al menos por ahora, estemos a miles de kilómetros.

Elia Diestra y Eva Sanmartín, qué podría decir que no sepáis ya... Poca cosa, ¿no? Gracias por haber estado siempre ahí. Sabéis que siempre formareis una parte importante de mi vida.

A mis padres Daniel y Merce, y a mi hermana Gema, por apoyarme siempre y por haberme ayudado con Abril durante la escritura de la tesis.

Quien más me ha ayudado durante la realización de esta tesis es More, que durante tanto tiempo sufrió sus efectos secundarios. Gracias por haber estado siempre a mi lado y por no haberme fallado nunca, ni siquiera en los momentos más difíciles. Fuiste siempre mi guía y apoyo, y estoy orgullosa de haber compartido contigo más de la mitad de mi vida. Gracias por ser como eres.

La escritura de esta tesis no hubiera sido posible sin Luca... Gracias por ese último empujoncito, por levantarme cuando caía, por dejarme tu “quiet place”, por sufrir con paciencia mis cambios de humor y por devolverme la ilusión por la investigación. Pero sobre todo, gracias por darme todo y por demostrarme que lo imposible se puede hacer posible.... Eres increíble. Te quiero.

Abril gracias por tu eterna sonrisa. Eres mi luz y mi alegría, contigo soy capaz de todo.

¡GRACIAS A TODOS!

ÍNDICE

ÍNDICE**i****ABREVIATURAS****vii****RESUMEN****1****INTRODUCCIÓN****5**

1. VIRUS: GENERALIDADES.....	7
2. ARBOVIRUS.....	8
3. VIRUS DEL GÉNERO <i>ORTHOBUNYAVIRUS</i>	
3.1. Generalidades.....	10
3.2. Enfermedades.....	12
3.3. Virus Bunyamwera.....	12
3.4. Vectores artródodos: <i>Aedes albopictus</i>	13
3.5. Genoma viral.....	16
3.6. Proteínas virales	
- Polimerasa viral, L.....	17
- Glicoproteínas de la envuelta, Gc y Gn.....	18
- Proteína no estructural NSm.....	19
- Proteína de la nucleocápsida, NC.....	20
- Proteína no estructural NSs.....	20
3.7. Ciclo de replicación	
- Entrada.....	21
- Transcripción y traducción.....	22
- Replicación del genoma.....	24
3.8. Ensamblaje: Factorías virales.....	25
3.9. Evolución.....	28
3.10. Silenciamiento de proteínas celulares.....	29
3.11. Apoptosis.....	29
3.12. Infección lítica versus infección persistente.....	31

4. NUEVOS MÉTODOS DE MICROSCOPIA PARA EL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ENTRE VIRUS Y CÉLULAS.....	35
--	----

OBJETIVOS	41
------------------	-----------

MATERIALES Y MÉTODOS	45
-----------------------------	-----------

1. MATERIALES DE TRABAJO	
1.1. Células y virus.....	47
1.2. Anticuerpos y sondas.....	48
1.3. Enzimas y otros reactivos.....	50
1.4. Soluciones de trabajo.....	51
2. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS	
2.1. Digestión con las enzimas endoH y PGNasaF.....	51
2.2. Electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS).....	52
2.3. Inmunotransferencia e inmunomarcaje (“Western Blot”).....	52
3. BIOLOGÍA MOLECULAR	
3.1. Obtención de plásmidos recombinantes con proteínas de fusión del BUNV con el “tag” MT.....	53
3.2. Ensayo de funcionalidad de la polimerasa recombinante.....	57
3.3. Generación de virus recombinantes con “tag” MT.....	57
4. BIOLOGÍA CELULAR	
4.1. Mantenimiento de líneas celulares.....	58
4.2. Tratamiento con sales de oro.....	59
4.3. Infecciones con BUNV	
4.3.1. Infección convencional.....	59
4.3.2. Infección mediante centrifugación.....	59
4.4. Producción de partículas virales (“stocks” virales)	
4.4.1. “Stocks” de trabajo.....	60
4.4.2. “Stocks” élite.....	60

4.5. Titulación	
4.5.1. En células de mamífero (Vero y BHK-21).....	61
4.5.2. En células de mosquito (C6/36).....	61
4.6. Purificación de partículas virales.....	62
5. MICROSCOPÍA ÓPTICA	
5.1. Visualización de células en cultivo.....	63
5.2. Localización de proteínas virales y celulares mediante ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA).....	64
5.3. Vídeo-microscopía.....	64
6. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	
6.1. Réplicas metálicas de partículas virales.....	65
6.2. Inclusión de muestras para estudios ultraestructurales.....	65
6.3. Inclusión de muestras para inmunocitoquímica.....	66
6.4. Cortes de secciones ultra-finas.....	68
6.5. Inmunomarcajes con conjugados de oro coloidal.....	68
6.6. Tinción de muestras	
6.6.1. Tinción negativa de virus.....	69
6.6.2. Tinción de cortes.....	69
7. PROCESAMIENTO DE IMÁGENES.....	70

RESULTADOS

73

1. El ciclo vital del BUNV en células C6/36 presenta tres fases diferenciadas.....	73
2. El BUNV induce cambios morfológicos en las células, provoca la formación de prolongaciones y un aumento de contactos intercelulares.....	77
3. Acumulación de proteína viral NC en el citoplasma: Formación de “N-bodies”	81
4. El aparato de Golgi es el sitio de ensamblaje del BUNV en células C6/36.....	84
5. Factoría viral y morfogénesis del BUNV en células C6/36.....	86
6. La estructura y composición de los viriones del BUNV es diferente en virus generados por células de mamífero o células de mosquito.....	91
7. Estudio de mutantes del BUNV que contienen una delección parcial en la proteína NSm. Infección en células de mamífero.....	95

8. Estudio de mutantes del BUNV que contienen una delección parcial en la proteína NSm. Infección en células de mosquito.....	98
9. Generación de virus recombinantes con “tag” de MT.....	102
10. Optimización previa de condiciones para el estudio de BUNV-L-MT <i>in vitro</i>	104
11. Optimización previa de condiciones para el estudio de BUNV-L-MT <i>in vivo</i>	105

DISCUSIÓN	109
------------------	------------

1. Dinámica de la infección por BUNV en células de mosquito (C6/36).....	111
2. Posibles funciones de la proteína viral NSm.....	119
3. Generación de BUNV recombinante con un “tag” de MT y puesta a punto del protocolo para su estudio en células mediante METTEM.....	124

CONCLUSIONES	127
---------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA	131
---------------------	------------

ANEXOS	153
---------------	------------

ABREVIATURAS

2-5 OAS	2'-5'oligoadelilato sintetasa
3D	Tridimensional
AcUr	Acetato de Uranilo
Ago2	Argonauta 2
AKAV	Virus Akabane
ATCC	Colección americana de cultivos tipo (del inglés "American Type Culture Collection")
AuT	Aurotiomalato
BHK-21	Fibroblastos de riñón de hámster (del inglés "Baby Hamster Kidney cells")
BrEt	Bromuro de Etidio
BSA	Albúmina de suero bovino (del inglés "Bovine Serum Albumin")
BUNV	Cepa original del virus Bunaymwera
CB	Tampón para citoesqueleto (del inglés "Cytoskeleton Buffer")
CCD	Dispositivo de carga acoplada (del inglés Charge-Coupled Device")
CCHFV	Virus de la fiebre hemorrágica Crimea-Congo
cDNA	DNA complementario
CitPb	Citrato de Plomo
CLEM	Microscopía correlativa (del inglés "Correlative Light Electron Microscopy")
cols.	Colaboradores
crioET	Crio tomografía electrónica
cRNA	RNA complementario al RNA genómico viral
DAB	Diaminobencidina
DAPI	Diclorato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DENV	Virus del Dengue
DIC	Contraste de Interferencia Diferencial (del inglés Differential Interference Contrast")
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco (del inglés "Dulbecco Modified Eagle Medium")
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (del inglés "Desoxirribonucleic Acid")
dpi	Días post infección
dsRNA	RNA de doble cadena (del inglés "Double Stranded RNA")
ECDC	Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades (del inglés "European Centre for Disease Prevention and Control")
eds	Editores
EDTA	ácido etilen-diamino-tetra-acético
EGTA	ácido etilen-glicol-amino-tetra-acético
EndoH	endo-β-N- acetilglucosaminidasa
ET	Tomografía electrónica (del inglés "Electron Tomography")
FA	Formaldehido
FBS	Suero fetal bovino (del inglés "Fetal Bovine Serum")
FFU	Unidades formadoras de focos de fluorescencia (del inglés "Fluorescent Focus Unit")
Flash	"Fluorescein based Arsenical Hairpin Binder"
GA	Glutaraldehido
Gc	Glicoproteína carboxilo terminal

GFP/EGFP	Proteína verde fluorescente (del inglés “Green Fluorescent Protein/Enhanced Green Fluorescent protein”)
Gn	Glicoproteína amino terminal
GRAB	“GFP Recognition After Bleaching”
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperacín-N’-2-Etanosulfónico
HPF	Congelación a alta presión (del inglés “High Pressure Freezing”)
hpi	Horas post infección
ICTV	Comité Internacional en Taxonomía Viral (del inglés “International Committee of Taxonomy of Viruses”)
IFA	Ensayo de Inmunofluorescencia (del inglés “Immuno Fluorescence Assay”)
IFN	Interferón
IP	Inhibidores de proteasas
IRF3	Factor regulador de IFN 3 (del inglés “IFN regulator Factor 3”)
ISG	Genes estimulados por IFN (del inglés “IFN Stimulated Genes”)
kDa	KiloDalton
L	Polimerasa viral del BUNV
LACV	Virus LaCrosse
MDA5	Gen asociado a la diferenciación del melanoma-5 (del inglés “Melanoma differentiation associated gene-5”)
ME	Microscopio electrónico
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidrato
METTEM	“Metal Tagging for Transmission Electron Microscopy”
MOI	Multiplicidad de infección (del inglés “Multiplicity of Infection”)
MQ	Agua ultrapura
miniSOG	“mini Singlet Oxygen Generator”
miRNA	micro RNA
mRNA	RNA mensajero
MT	Metalotioneína
MX	Proteínas de resistencia a Myxovirus
N	Asparagina
NC	Proteína de la nucleocapsida del BUNV
NCR	Región no codificante (del inglés “Non Coding Region”)
NGAV	Virus Ngari
NSm	Proteína no estructural traducida del segmento M (del inglés “Non Structural Protein S”)
NSs	Proteína no estructural traducida del segmento S (del inglés “Non Structural Protein S”)
nt	Nucleótido
ON	Toda la noche (del inglés “Over Night”)
ORF	Marco abierto de lectura (del inglés “Open Reading Frame”)
OROV	Virus Oropouche
PALM	Microscopía de localización por foto-activación (del inglés “Photoactivation Localization Microscopy”)
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés “Pathogen-Associated Molecular Patterns”)
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés “Phosphate Buffered Saline”)
PFA	Paraformaldehído
PFU	Unidades formadoras de placa de lisis (del inglés “Plaque Forming Unit”)

PNGasaF	N-glicosidasa F
Poli-A	Cola de poli adenosina
ReAsH	“Resorufin based Arsenical Hairpin”
RIG-I	Proteína citoplásmica I inducible por el ácido retinoico (del inglés “Retinoic Inducible Gen I”)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés “Polymerase Chain Reaction”)
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
piRNA	RNA inter-actuante con PIWI
PKR	Proteína quinasa R
POD	Peroxidasa de Rabano
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones (del inglés “Pattern Recognition Receptors”)
PTA	Ácido fosfotúngstico
RB	Conejo (del inglés “Rabbit”)
RC	Complejo replicativo (del inglés “Replication Complex”)
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RISC	Complejo multiproteico RNA inductor de silenciamiento (del inglés “RNA Induced Silencing Complex”)
RNA	Ácido ribonucleico (del inglés “Ribonucleic Acid”)
RNAi	RNA de interferencia
RNAPII	RNA polimerasa II
RNAsa	Ribonucleasa
RNP	Ribonucleoproteína
RT	Temperatura ambiente (del inglés “Room Temperature”)
STING	Gen estimulador de interferón (del inglés “Stimulating IFN Genes”)
STORM	Microscopía de reconstrucción estocástica (del inglés “Stochastic Optical Reconstruction Microscopy”)
SV5	Virus del Simio 5
SV40	Virus del Simio 40
RVFV	Virus de la fiebre del Valle del Rift (del inglés Rift Valley Fever Virus”)
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (del inglés “SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis”)
siRNA	RNA de pequeño tamaño (del inglés “Small Interfering RNA”)
ssRNA	RNA monocatenario (del inglés “Single Stranded RNA”)
TBG	Solución de bloqueo para inmunomarcaje (del inglés “Tris Buffered Gelatin”)
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TLR	Receptores tipo Toll (del inglés “Toll Like Receptors”)
TN	Tinción negativa
TPB	Caldo fosfato triptosa (del inglés, “Tryptose Phosphate Buffer”)
Tris	Trihidroximetil amino metano
U	Unidades
UV	Ultravioleta
VE	Virus extracelular
VI	Virus intracelular tipo I
VII	Virus intracelular tipo II

vRNA	RNA viral
WB	“Western Blot”
WNV	Virus del Oeste del Nilo (del inglés “West Nile Virus”)

RESUMEN

Arboviruses, or arthropod-borne viruses, are important causes of epidemic and endemic disease in many countries all over the world. Most arboviruses are RNA viruses mainly of the families *Bunyaviridae*, *Flaviviridae* and *Togaviridae*. In nature, arboviruses are spread by arthropod vectors, predominantly mosquitoes, ticks, flies and midges to vertebrate hosts. Yellow fever, Dengue fever, West Nile fever, Rift Valley fever, La Crosse encephalitis, Chikungunya arthritis or Crimean-Congo haemorrhagic fever are some of the arbovirus-associated emerging and re-emerging diseases. With the only exception of Yellow fever virus there are no vaccines, nor efficient treatments, against pathogenic arboviruses. In their vertebrate hosts, arboviruses generally counteract innate defences and trigger a highly cytopathic infection that leads inevitably to cell death. However, in mosquito cells an early phase of efficient viral protein synthesis and virus production is followed by a persistent infection with low levels of viral protein expression and virus release. Little is known about how arthropod cells react to arbovirus infection, not even for Dengue, the most important human arbovirus with almost half of the world's population at risk.

In this work, we have studied how C6/36 cells, derived from *Aedes albopictus*, one of the relevant vectors for arboviruses, respond to Bunyamwera virus, a well-characterized arbovirus. Confocal, live cell microscopy and electron microscopy showed that Bunyamwera virus (BUNV) induces deep changes in mosquito cells. Early in infection these cells develop long projections and create new intercellular connections where cell organelles and viral proteins were detected. Live cell microscopy showed that these connections were developed before viral protein could be detected by immunofluorescence. Interestingly, their proliferation was accompanied by a progressive trapping of the nucleocapsid and RNA polymerase viral proteins into large cytoplasmic aggregates. A significant drop in the release of infectious virions then followed. Before that, numerous viruses assembled in peripheral Golgi stacks and they apparently exit the cells immediately since they did not accumulate intracellularly. This mechanism of assembly seems to cause little damage to the integrity of cell endomembranes. The characterization of the antiviral mechanisms operating in mosquito cells can be of great help in the fight against pathogenic arboviruses.

The Orthobunyavirus non structural protein NSm is thought to be important in the assembly and morphogenesis of viruses and replication organelles. However, NSm proteins have not been well characterized and probably, as many other proteins from RNA viruses, they probably harbor multiple domains and functions.

Confocal and electron microscopy studies with BUNV NSm deletion mutants showed that NSm protein is a key factor for the formation of the tubular domain of the replication organelle in mammalian cells. Our studies also suggested that these

cylinders are not involved in viral genome replication that takes place in the globular domain of the organelle, but in connecting viral replication and assembly.

NSm deletion mutants appeared to produce more aggressive infections in both mammalian and mosquito cells; viral particles were produced earlier and in higher amounts than with the wild type virus. This caused a more severe cytotoxic effect in mammalian cells. However, mosquito cells were still able to survive and entered into the persistent phase of the infection. These results strongly suggest that NSm might delay infection in both cell lines and that this “negative” regulation would not interfere with the development of persistence in mosquito cells.

Despite of our extensive search by conventional EM methods, BUNV replication organelles have not yet been identified in mosquito cells. To this purpose, and for a better characterization of these organelles in infected mammalian cells, we have designed and generated a new tool that consists of a recombinant BUNV with the viral polymerase L protein fused to metallothionein (MT); this is a small metal-binding protein that works as a clonable tag for electron microscopy recently validated in our lab. We have also optimized the protocols for treating mammalian cells with gold salts and subsequent visualization of MT-tagged proteins in cells by metal-tagging transmission electron microscopy (METTEM).

With the L-MT recombinant BUNV we will study the biogenesis and structure of replication complexes in replication organelles by METTEM, a method that allows visualization of proteins in their natural environment and at molecular scale resolution.

INTRODUCCIÓN

1. VIRUS: GENERALIDADES.

Los virus son agentes microscópicos infecciosos y parásitos obligados que, en el hospedador adecuado, replican su genoma y dirigen la síntesis de los componentes de los nuevos viriones. Invaden células y parasitan la maquinaria subcelular utilizándola en su propio beneficio. Las formas más básicas consisten únicamente en un pequeño segmento de ácido nucleico encapsidado en un escudo proteico simple.

La progenie viral se forma por el ensamblaje de los componentes recién sintetizados en la célula hospedadora infectada. Esta progenie es el vehículo para la transmisión del genoma viral a la siguiente célula u organismo huésped en donde, tras la infección, comenzará el siguiente ciclo infectivo (Flint y cols., 2000).

La clasificación de los virus se lleva a cabo por el Comité Internacional en Taxonomía Viral (ICTV, del inglés “International Committee of Taxonomy of Viruses”). La ICTV es un comité de la División de Virología de la Unión Internacional de las Sociedades de Microbiología, cuyo objetivo es desarrollar una taxonomía y nomenclatura internacionalmente aceptada. Está se lleva a cabo según diferentes características como la naturaleza del genoma, simetría de la cápsida, presencia o ausencia de envuelta, y dimensiones del virión y la cápsida, entre otras (figura 1).

La ICTV publica informes de sus reuniones aproximadamente cada tres años. Hasta la fecha el más reciente es la 9ª memoria correspondiente al año 2009 (<http://www.ictvonline.org/>).

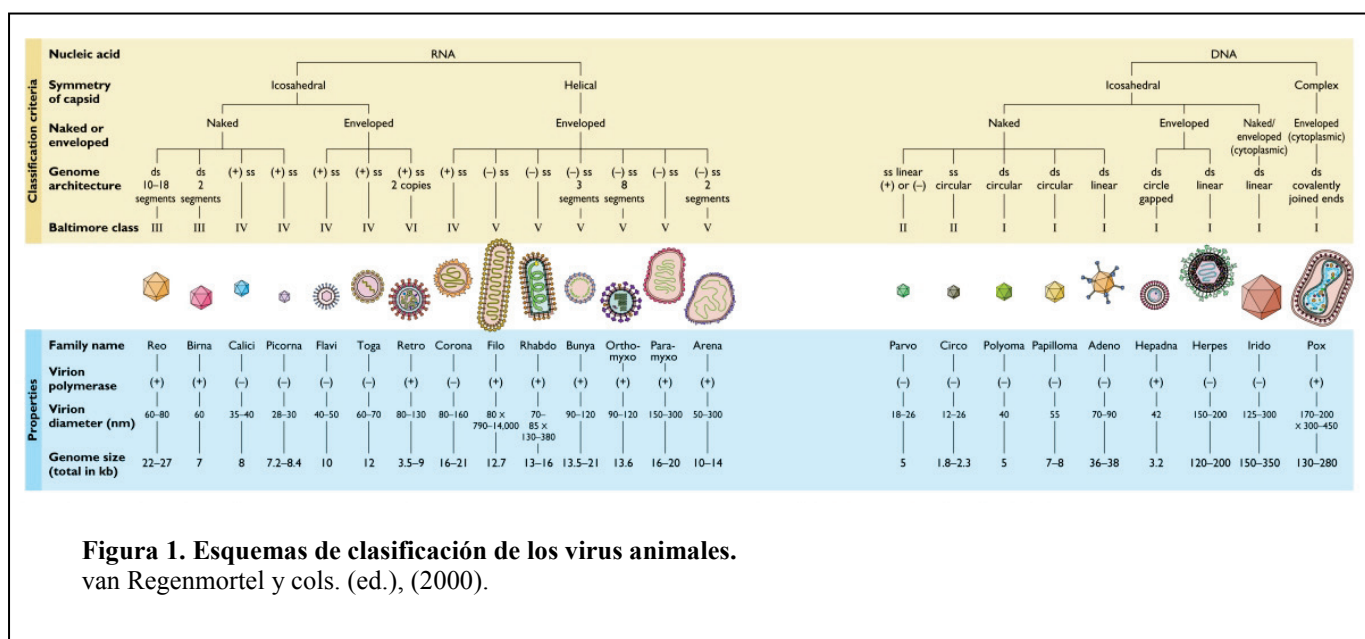


Figura 1. Esquemas de clasificación de los virus animales.
van Regenmortel y cols. (ed.), (2000).

2. ARBOVIRUS.

El término arbovirus es un acrónimo que proviene del inglés “arthropod borne virus” (virus transmitidos por artrópodos). Es un grupo heterogéneo de virus cuya característica común es la de ser transmitidos a través de un vector artrópodo a un organismo hospedador vertebrado. La mayoría pertenecen a las familias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* y *Bunyaviridae* (Karabastos, 1985).

Los principales vectores son dípteros y garrapatas, y los principales reservorios aves y roedores. La distribución geográfica de estos virus viene determinada por la distribución del binomio vector/huésped, aunque muchos de ellos tienen distribución mundial (Weaver y Reisen, 2010).

Las arbovirosis de mayor importancia clínica para el hombre se listan en la figura 2. En el hombre la mayoría de las arbovirosis ocurren accidentalmente, cuando el vector infecta a un ser humano en lugar de a su huésped vertebrado principal. Suelen transcurrir de forma asintomática y normalmente el resultado es una vía muerta para la transmisión del virus, ya que la viremia suele ser de corta duración y bajo título. Sin embargo, cada vez más las arbovirosis están siendo un problema sanitario de ámbito mundial, ya que muchos de estos virus son capaces de provocar enfermedades, desde un

Virus	Vector	Huésped	Clínica	Distribución geográfica
<i>Togaviridae / Alphavirus</i>				
Chikungunya	Mosquitos	Humanos, primates	SF, PA	Af, As
Ross River	Mosquitos	Humanos, marsupiales	SF, PA	O
Mayaro	Mosquitos	Aves	SF	AS
O'nyong-nyong	Mosquitos	¿?	SF	Af
Sindbis	Mosquitos	Aves	SF	As, Af, O, E, A
Barmah Forest	Mosquitos	¿?	SF, PA	O
Encefalitis equina oriental	Mosquitos	Aves	SF, ME	A
Encefalitis equina occidental	Mosquitos	Aves, conejos	SF, ME	A
Encefalitis equina de Venezuela	Mosquitos	Roedores	SF, ME	A
<i>Flaviviridae / Flavivirus</i>				
Dengue 1-4	Mosquitos	Humanos, primates	SF, FH	Trópicos
Fiebre amarilla	Mosquitos	Humanos, primates	SF, FH	Af, AS
Encefalitis japonesa	Mosquitos	Aves, cerdos	SF, ME	As, Pacífico
Encefalitis del Valle Murray	Mosquitos	Aves	SF, ME	Australia
Rocio	Mosquitos	Aves	SF, ME	AS
Encefalitis de San Luis	Mosquitos	Aves	SF, ME	A
Virus del Nilo occidental	Mosquitos	Aves	SF, ME	Af, E, AN
Enfermedad de los bosques de Kyasanur	Garrapatas	Primates, roedores, camellos	SF, FH, ME	India, Arabia Saudi
Omsk	Garrapatas	Roedores	SF, FH	As
Encefalitis transmitida por garrapatas	Garrapatas	Aves, roedores	SF, ME	E, As, AN
<i>Bunyaviridae / Phlebovirus</i>				
Fiebre del flebotomo	Flebotomos	¿?	SF,	E, Af, As
Fiebre del Valle Rift	Mosquitos	¿?	SF, ME, FH	Af, OM
Virus de Toscana	Flebotomos	¿?	SF, M, ME	Mediterráneo
<i>Bunyaviridae / Bunyavirus</i>				
Encefalitis de la Crosse	Mosquitos	Roedores	SF, ME	AN
Encefalitis de California	Mosquitos	Roedores	SF, ME	AN, E, As
Oropouche	Midges	¿?	SF	A
<i>Bunyaviridae / Nairovirus</i>				
Fiebre hemorrágica del Congo-Crimea	Garrapatas	Roedores	SF, FH	E, As, Af

FH: fiebre hemorrágica; M: Meningitis; ME: meningoencefalitis; PA: poliartrosis; SF: síndrome febril.
Af: África; AN: América del Norte; AS: América del Sur; As: Asia; E: Europa; O: Oceanía; OM: Oriente Medio.

Figura 2. Lista de los arbovirus de mayor importancia clínica para el hombre.
Adaptada de Sanchez-Seco y cols., (2005).

síndrome febril auto-limitado hasta cuadros neurológicos graves (meningitis o meningo-encefalitis) o fiebres hemorrágicas, muchas de ellas mortales (Tsai y Chandler, 2003).

La mayoría de estas enfermedades han sido catalogadas como emergentes o reemergentes por haberse introducido en las últimas décadas en nuevas áreas geográficas o haberse producido un incremento en zonas en donde se creían controladas.

Las causas son múltiples y tienen que ver con la globalización (por el desarrollo de las comunicaciones, aumento de la movilidad poblacional y mercantil...), el cambio climático (por el aumento de las temperaturas que favorecen la expansión del vector) y las actividades de origen antrópico (por la incursión humana en nuevos ecosistemas, modificación de los hábitats del vector...) (Harvell y cols., 2002; Elliott, 2009).

Algunos ejemplos son las recientes epidemias del Dengue (Gubler, 1998), fiebre amarilla (Barnett, 2007), fiebre del valle del Rift, encefalitis japonesa o encefalitis por el virus del Oeste del Nilo (WNV, del inglés “West Nile Virus”) (Weaver y Reisen, 2010).

Las arbovirosis de mayor importancia sanitaria en Europa son las encefalitis transmitidas por la mordedura de garrapatas, sobre todo en países del centro y este europeo, e infecciones transmitidas por picadura de flebótomos en países mediterráneos. No obstante, cada vez ocurren con más frecuencia casos esporádicos de encefalitis por el WNV, y existe una gran preocupación por la introducción de arbovirosis propias de otras latitudes como las producidas por los virus Chikungunya, virus Sindbis, virus de la fiebre del Valle del Rift (RVFV) o virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (CCHFV) (Sanchez-Seco y Navarro, 2005).

Hasta la fecha el único arbovirus patógeno para el hombre, cuya infección se haya producido en España, es el phlebovirus Toscana (Sanbonmatsu-Gámez y cols, 2005), que produce meningitis linfocitaria de evolución benigna (Charrel y cols, 2005). Aunque el reciente gran aumento en la población de mosquitos transmisores de arbovirus como *Aedes albopictus* (Skuse), conocido como mosquito tigre, hacen predecir un rápido incremento de este tipo de enfermedades virales (Benedict y cols., 2007; Wymann y cols., 2008), ya que se acepta el hecho de que una vez establecido un vector en un nuevo ambiente, los virus a los que son susceptibles al final los seguirán (Mackenzie y cols., 2004).

3. VIRUS DEL GENERO ORTHOBUNYAVIRUS.

3.1. Generalidades.

El género *Orthobunyavirus* forma parte de la familia *Bunyaviridae*. Esta familia se estableció formalmente en 1975 y contiene más de 350 aislados clasificados dentro de los cinco géneros que comprende, siendo cuatro de ellos virus animales: *Orthobunyavirus*, *Plebovirus*, *Nairovirus*, *Hantavirus*; y uno de plantas: *Tospovirus* (Nichol y cols., 2005). A los virus de esta familia se los conoce comúnmente como bunyavirus.

Son virus de genoma segmentado formado por ácido ribonucleico de cadena sencilla (ssRNA, del inglés “Single Stranded Ribonucleic Acid”) y polaridad negativa. Son pleomórficos con envuelta, de aproximadamente 100 nm (figura 4) y simetría icosaédrica (Overby y cols., 2008). Los miembros de la familia comparten una estrategia común para las cuatro proteínas estructurales (Elliott y Blakqori, 2011) (figura 3):

- El segmento L (del inglés “large”) codifica la polimerasa viral (L), una RNA polimerasa RNA dependiente,
- El segmento M (del inglés “medium”) codifica las dos glicoproteínas de la envuelta viral, Gc y Gn.
- El segmento S (del inglés “small”) codifica la proteína de la nucleocápsida (NC).

Adicionalmente, muchos bunyavirus codifican proteínas no estructurales. Existe variación entre géneros de las estrategias de codificación, posición relativa en relación a las proteínas estructurales e incluso en la polaridad de transcripción en los segmentos genómicos (Nichol y cols, 2005).

Los virus de la familia a excepción de los hantavirus, que se transmiten horizontalmente por excreciones aerosolizadas de roedores en donde pueden persistir por muchos años sin sintomatología aparente, son arbovirus. Los vectores más frecuentes son mosquitos (géneros *Aedes*, *Culex* y *Anopheles*), garrapatas (*Hyalomma*), flebótomos y tisanópteros (Walter y Barr, 2011).

El género *Orthobunyavirus* es el más grande de la familia, comprende 170 virus incluyendo el prototipo de la familia, el virus Bunyamwera (BUNV). Comúnmente se los conoce como orthobunyavirus.

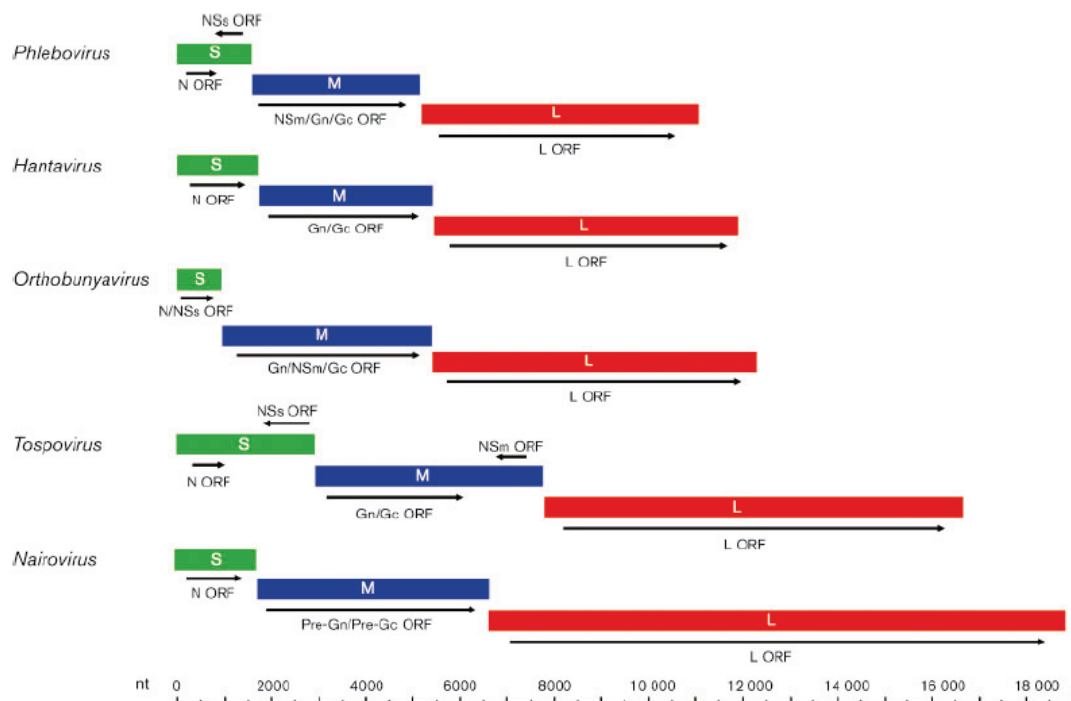


Figura 3. Representación esquemática de los RNA genómicos de los miembros prototipo de cada uno de los géneros de la familia *Bunyaviridae*.

Todos los bunyavirus tienen los tres segmentos genómicos (S en verde, M en azul, y L en rojo). Las flechas indican los marcos abiertos de lectura (ORF, del inglés “Open ReadinG Frame”). Walter y Barr, (2011).

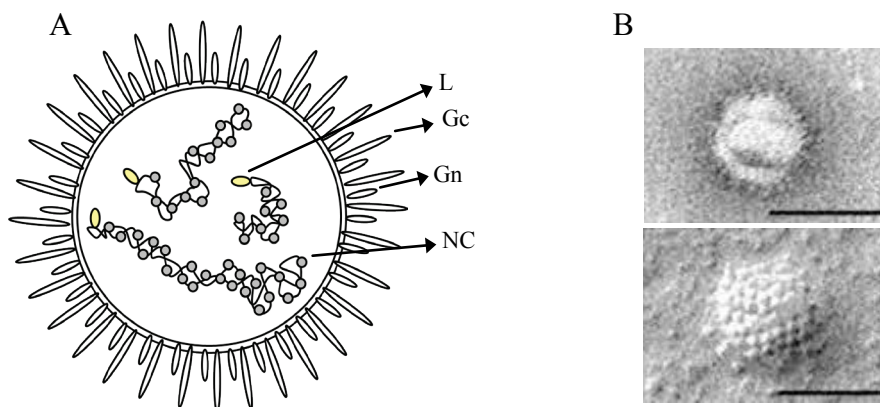


Figura 4. Representación esquemática de un bunyavirus genérico.

(A) Esquema de un bunyavirus. En el interior del virus se muestran las ribonucleoproteínas (RNPs) en donde el RNA genómico está asociado con las proteínas NC y L, y en la envuelta las glicoproteínas que forman las espículas (Gn y Gc). (B) Tinción negativa (arriba) y sombreado metálico con Tántalo (abajo) del BUNV. Los contornos y la superficie muestran que el virus presenta un contorno angular compatible con una posible simetría icosaédrica y espículas definidas. Novoa y cols., (2005 b). Barras: 100 nm.

Está dividido en 18 serogrupos: Anopheles A, Anopheles B, Bakau, Bunyamwera, Bwamba, Group C, Capim, California, Gamboa, Guama, Koongol, Minatitlan, Nyando, Olifanstlei, Patois, Simbu, Tete y Turlock. Están clasificados por estudios serológicos, como fijación del complemento, neutralización e inhibición de la hemaglutinación. Cada grupo contiene virus o tipos relacionados pero antigénicamente distintos (Elliott y Blakqori, 2011).

3.2. Enfermedades.

Existen muchos ejemplos de orthobunyavirus patógenos para hombres y animales, al menos 30 de ellos se asocian a enfermedades en humanos como el virus La Crosse (LACV) y Oropouche (OROV), causando un rango de enfermedades desde cuadros febriles a encefalitis o fiebres hemorrágicas (Elliott, 1997).

El LACV en el medio oeste de Estados Unidos causa encefalitis severa y meningitis aséptica en niños y adultos jóvenes (McJunkin y cols, 2001) con un 10% de secuelas neurológicas posteriores. Se dan unos 300.000 casos al año en esta zona.

Otros virus como el virus de la encefalitis de California, el virus del Cañón Jamestown y virus Snowshoe Hare se han asociado a enfermedades en Norte América, así como los virus Inkoo y Tahyna en Europa. En África el virus Ngari (NGAV) provoca fiebre hemorrágica (Bowen y cols, 2001).

La infección por OROV es la segunda arbovirosis más común en Brasil después de la fiebre del Dengue (Pinheiro y cols, 1981). Durante los últimos 40 años ha emergido como un problema de salud pública en áreas tropicales de América del Centro y Sur (Azevedo y cols, 2007).

Otros virus causan abortos o efectos teratogénicos en ganado, como el virus Akabane (AKAV) en Australasia y Medio Este y el Cache Valley en las Américas (Elliott, 1997; Borucki y cols, 2002).

3.3. Virus Bunyamwera.

El BUNV es el virus utilizado en nuestro estudio, ya que es el prototipo de la familia *Bunyaviridae* y del género *Orthobunyavirus*.

Como ya hemos descrito anteriormente, muchos bunyavirus producen graves enfermedades en el hombre. Sin embargo, el BUNV produce enfermedades subclínicas o cuadros febriles leves.

El BUNV fue aislado por primera vez por Smithburn en 1943 durante la recolección de mosquitos del género *Aedes* en Bunyamwera, una región deshabitada del bosque Semliki en Uganda (Smithburn y cols, 1946).

Este aislado se inoculó en un espécimen primate mediante inyección subcutánea produciéndose síntomas las 44 h. Una muestra *postmortem* de hígado fue inyectada intracranealmente en ratones lactantes, los cuales desarrollaron encefalitis y murieron. El primer caso documentado de un humano con síntomas adquiridos por infección natural con BUNV fue un joven recolector de mosquitos en Maputaland (sur de Africa). Sufrió fiebre moderada, dolor de cabeza y rigidez de cuello, los síntomas duraron dos días tras lo cual se pudieron detectar anticuerpos específicos en el individuo (Kokernot y cols., 1958).

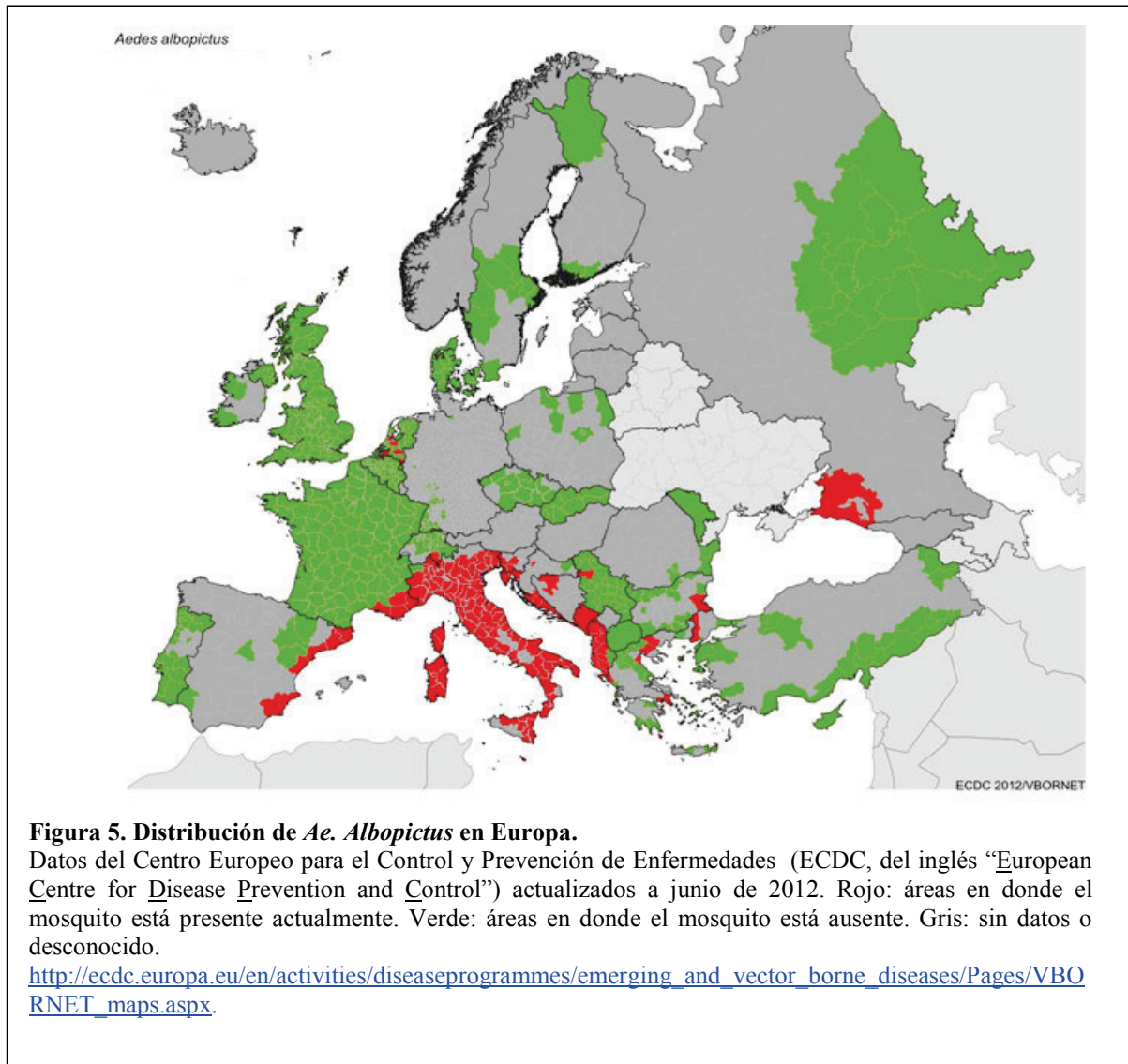
Este virus dio nombre al grupo de arbovirus Bunyamwera (Casals y Whitman, 1960), el supergrupo Bunyamwera (Casals, 1963), la familia *Bunyaviridae* y el género *Bunyavirus* (Bishop y cols, 1980) que fue renombrado Orthobunyavirus posteriormente (Nichol y cols., 2005). Fue el primer bunyavirus cuyo genoma fue secuenciado (Lees y cols., 1986; Elliott, 1989 a y b) y el primer virus con genoma RNA negativo segmentado en ser recuperado mediante transfección de células con ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA, del inglés “Complementary Desoxiribonucleic Acid”) clonado (Bridgen y Elliott, 1996).

3.4. Vectores artrópodos: *Aedes albopictus*.

Recientemente, muchos de los vectores artrópodos involucrados en el ciclo vital de virus de la familia *Bunyaviridae*, como garrapatas del género *Hyalomma* (CCHFV) y mosquitos de los géneros *Aedes*, *Culex* y *Anopheles* (RVFV), han aumentado, migrado y establecido en regiones más al norte de Europa posiblemente debido a cambios en el clima global (Maltezou y Papa, 2010).

Los vectores de los orthobunyavirus son mosquitos (Familia *Culicidae*), generalmente de los géneros *Aedes*, *Culex* o *Anopheles*, y los hospedadores pequeños mamíferos silvestres como ardillas u otros roedores (Beaty y Bishop, 1988).

Uno de los mosquitos vector más importantes para la transmisión de los bunyavirus, así como para otros arbovirus es *Ae. albopictus*, comúnmente llamado mosquito tigre. En zonas endémicas es transmisor del Dengue, la fiebre amarilla y la encefalitis por WNV (Gratz, 2004). En el verano de 2007 fue el responsable de un brote epidémico de fiebre Chikungunya en Rávena (Italia) que hasta entonces sólo se había dado en zonas tropicales (Bonilauri y cols, 2008). La distribución del mosquito tigre se muestra en la figura 5.



El mosquito tigre es una especie invasora originaria del sudeste asiático, que desde finales de la década de los 70 se ha ido diseminando por África, América, Europa y posteriormente por la zona del Pacífico, proveniente principalmente del comercio de neumáticos usados y plantas ornamentales como el bambú de la suerte (*Dracaena sanderiana*) (Madon y cols., 2002).

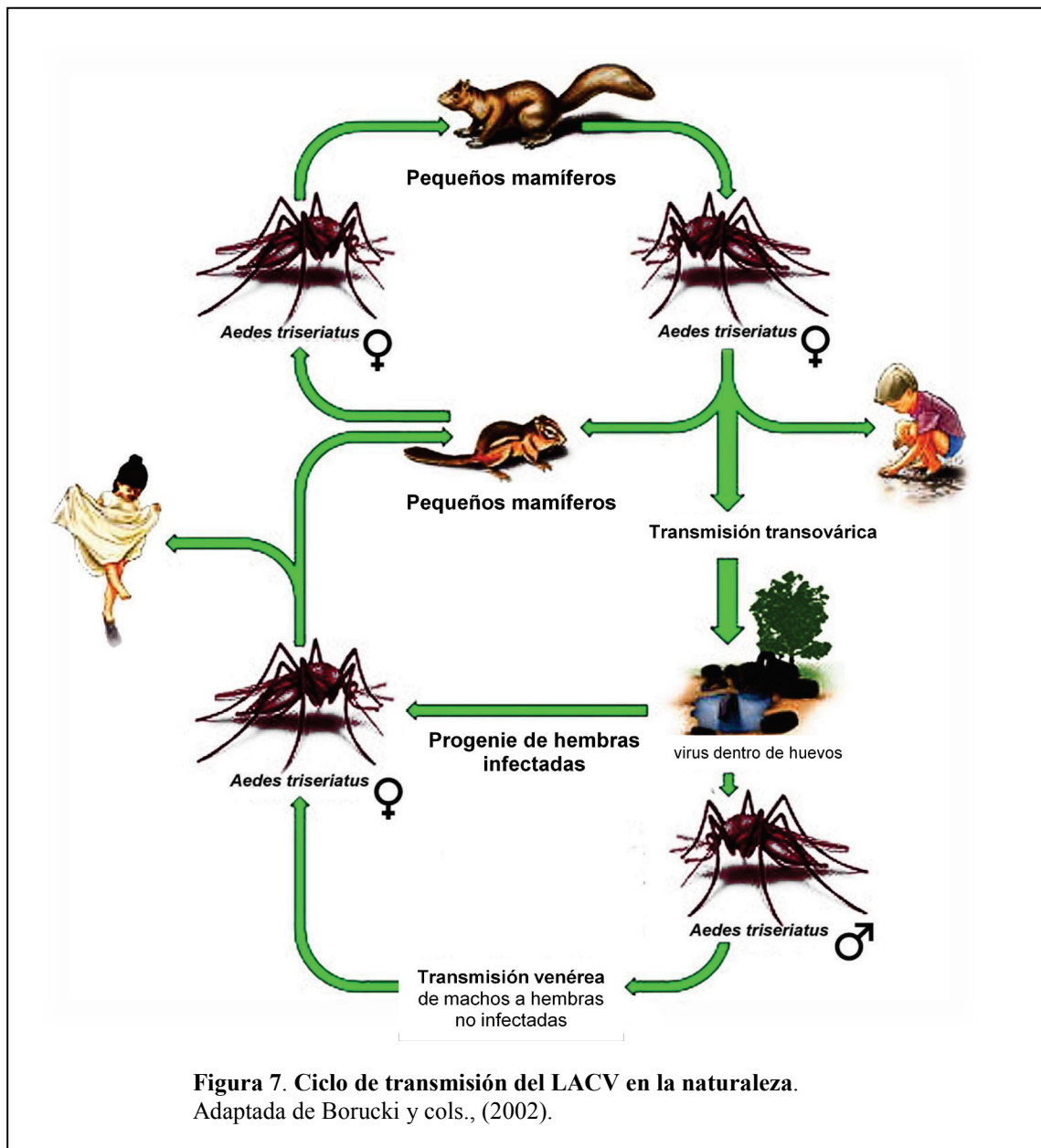
Su presencia en la Península Ibérica fue notificada por primera vez en 2004, en San Cugat del Vallés (Cataluña), desde donde continúa extendiéndose a poblaciones circundantes (Aranda y cols., 2006).

La hembra es hematófaga y su picadura, que se produce en horas diurnas, es muy molesta y puede incluso atravesar ropa fina. Por el contrario, los machos se alimentan de néctar. Es un mosquito que explota ambientes rurales y urbanos, aprovechando puntos con agua estancada de origen humano para su reproducción y cría de larvas. En la figura 6 se muestran imágenes del mosquito adulto, larvas y huevos.

En los vectores artrópodos, los buyavirus son capaces de multiplicarse y se dispersan tanto transovaricamente (transmisión vertical) (Tesh y Modi, 1987; Watts y cols., 1973) como de forma venérea (transmisión horizontal) (Thompson y Beaty, 1977). En la naturaleza la infección en el insecto vector es muy diferente de en el hospedador vertebrado, siendo predominantemente persistente en lugar de aguda, con liberación prolongada de virus muchos meses después de la infección. Como ejemplo del ciclo natural de los orthobunyavirus, se ilustra el ciclo del LACV en la figura 7.

En el artrópodo, la infección primaria ocurre en el intestino medio (si se produce a través de la ingestión de sangre de pequeños mamíferos infectados), tracto reproductor (si es por transmisión venérea) o en el huevo (si es por transmisión transovárica). De forma subsecuente se puede diseminar a muchos tejidos como al ganglio neural, músculos, hemolinfa, cuerpo graso y glándulas salivares (Borucki y cols., 2002). La naturaleza leve de la infección es una importante función para el mantenimiento de los orthobunyavirus en el insecto vector. Se ha visto que LACV tiene una actividad replicativa activa en huevos y larvas en desarrollo sin efectos deletéreos. De hecho, las hembras que han sido afectadas mediante esta ruta parecen tener ventajas de emparejamiento sobre mosquitos no infectados (Reese y cols., 2009).

La producción de partículas virales se reduce drásticamente en situaciones de hambruna pero crece otra vez después de tomar alimento (Borucki y cols., 2002).



3.5. Genoma viral.

Al igual que todos los miembros de la familia, los tres segmentos genómicos (L, M y S) de los orthobunyavirus se encuentran encapsidados por la proteína de la nucleocápsida (NC) formando complejos ribonucleoproteicos (RNPs). En el interior de la célula infectada el RNA viral no se encuentra desnudo, sino en forma de RNPs. Esto indica que la encapsidación ocurre concomitantemente a la síntesis del nuevo RNA. Esto sucede también para el RNA antígenómico (complementario o intermediario de replicación). De hecho, estas RNPs son los moldes funcionales necesarios para todos los eventos de síntesis de nuevo RNA viral (Elliott, 2005).

La señal de encapsidación para la interacción con la proteína NC está localizada en el extremo 5' tanto del RNA genómico como del antígenómico (Osborne y Elliott, 2000; Ogg y Patterson, 2007). NC se une más eficientemente a cadenas monocatenarias que al dsRNA (como se encuentra en las estructuras “panhandle” o mango de sartén) y se une de forma específica a motivos estructurales en lugar de a secuencias concretas.

Cada segmento genómico (L, M y S) se divide en tres regiones:

- Región no codificante 3' (3'NCR, del inglés “Non Coding Region”)
- Región codificante
- Región no codificante 5' (5'NCR)

Los 11 nucleótidos (nt) terminales de cada segmento están bien conservados en todos los orthobunyavirus, y los extremos 3' y 5' tienen secuencias complementarias invertidas para formar una estructura en forma de mango de sartén o “panhandle”. Inmediatamente después de esta región conservada se encuentra una región corta de 3-4 nt que está conservada en virus del mismo serotipo (Elliott y cols, 1991). Posteriormente las secuencias son altamente variables, incluso entre diferentes segmentos del mismo virus o en el mismo segmento de diferentes virus.

La longitud de las NCRs es altamente variable, incluso dentro de virus del mismo serogrupo. Sin embargo, las regiones codificantes son absolutamente conservadas en longitud.

Además de la señal de encapsidación con la proteína NC, las NCRs también contienen los promotores virales, las señales de terminación de la transcripción de los RNA mensajeros (mRNA) y, probablemente las señales de empaquetamiento de las RNPs (Dunn y cols, 1995; Osborne y Elliott, 2000; Flick y Pettersson, 2001; Weber y cols., 2001).

3.6. Proteínas virales.

Polimerasa viral, L.

La proteína L, codificada por el segmento L, es una RNA polimerasa RNA dependiente. Es la enzima catalítica para la síntesis de RNA viral, tanto transcripción como replicación. En la región central de la proteína está situado el modulo polimerasa, 4 motivos aminoacídicos denominados A-D, que están conservados en todas las RNA polimerasas (Poch y cols., 1989; Delarue y cols., 1990). El motivo conservado C contiene el dominio catalítico para la polimerización de nucleótidos. El dominio amino terminal contiene un motivo nucleasa conservado PD-(D/E)xK (Reguera y cols., 2010).

La localización citoplasmática de la proteína sigue un patrón puntuado-reticular que se concentra en el área perinuclear y, por estudios de fraccionamiento celular, se ha visto que se asocia a membranas (Shi y Elliott, 2009). En nuestro laboratorio estas observaciones han sido corroboradas mediante estudios de microscopía electrónica en donde se han caracterizado los orgánulos de replicación del BUNV en células de mamífero (Fontana y cols., 2008). Se ha comprobado interacción entre L y NC tanto por estudios de co-inmunoprecipitación (Elliott y Blakqori, 2011) como por ensayos de co-localización llevados a cabo en nuestro laboratorio.

Glicoproteínas de la envuelta, Gc y Gn.

Forman parte de la envuelta viral. Son proteínas integrales de membrana tipo I y son modificadas por N-glicosilación (glicosilación en el aminoácido asparagina, N) (Schmaljohn y Hooper, 2001; Shi y cols, 2005; Salanueva y cols., 2003; Novoa y cols., 2005 b). Son sintetizadas desde la poliproteína M, un precursor poliprotéico que también incluye una proteína no estructural (NSm) colocada en el medio de ellas (Fazakerley y cols, 1988). Son proteínas ricas en cisteína, con un porcentaje del 5%, muchas de ellas en posiciones conservadas que permiten establecer puentes disulfuro inter e intra-moleculares. De hecho, Gn y Gc forman un heterodímero en el retículo endoplásmico rugoso (RER) (Shi y cols., 2004) en donde son sintetizadas, aunque su localización final es el aparato de Golgi.

La señal de retención en el Golgi está en el dominio transmembrana de Gn. Por su parte, Gc necesita asociación con Gn para salir de RER, plegarse correctamente y transportarse al Golgi (Lappin y cols, 1994). La glicoproteína Gc funciona como una proteína de fusión clase II (Garry y Garry, 2004) pero también Gn es importante para los procesos de fusión de membrana (Shi y cols., 2007).

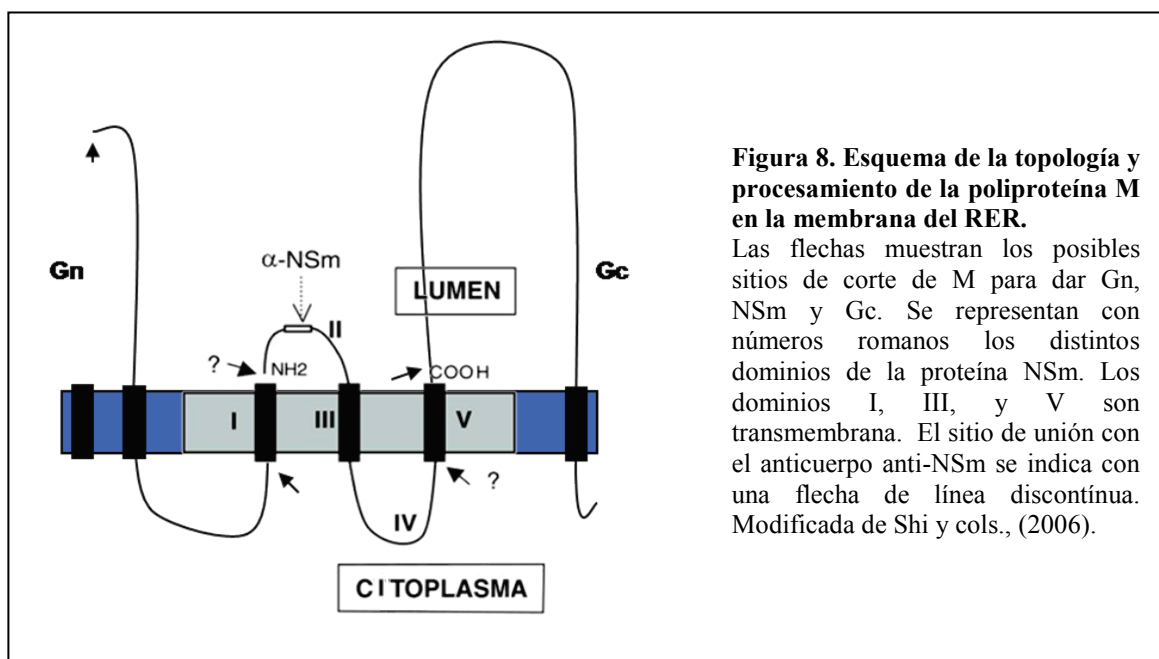
Existen sitios de glicosilación conservados para todos los virus del género. El sitio 1 (N60 en BUNV) en Gn y el sitio 3 (N1169 en BUNV) para Gc. Adicionalmente, BUNV tiene otro sitio de glicosilación, el sitio 2 en N624, conservado sólo en el serogrupo Bunyamwera (Briese y cols., 2004). Esto sugiere que la presencia de glicanos en N juega un papel funcional importante. El sitio de glicosilación en Gn es fundamental para la replicación del virus, su ausencia se traduce en un impedimento severo del plegamiento por lo que Gn y Gc que se quedan atrapados en el RER.

La glicosilación de Gc es dispensable para la replicación pero importante para la eficiencia de la infección. Está más involucrada en aspectos de la replicación viral que en promover el correcto plegamiento (Shi y cols., 2005). Virus mutantes que no tienen en Gc N-glicanos son capaces de infectar a células de mamífero en cultivo, con lo que no parecen ser esenciales para la unión del virus al receptor celular. Sin embargo, se

produce un menor título viral y las placas de lisis son más pequeñas. Esto es indicativo de que el efecto de estas glicosilaciones puede ser en etapas más tardías de la infección, en el ensamblaje o la liberación. (Shi y cols., 2009).

Proteína no estructural NSm.

Se sitúa en el segmento M entre Gn y Gc, que codifica la poliproteína precursora M. Lo más probable es que la ruptura entre Gn y NSm en la poliproteína M se produzca por una enzima tipo furina, ya que el carboxilo terminal de las proteínas Gn tienen la secuencia consenso R-X-X-R (Fazakerley y cols., 1988). NSm es una proteína integral transmembrana (Elliott, 1990; Fujiki y cols., 1982) (figura 8) y tiene interacciones con el carboxilo terminal de Gn. NSm no está involucrada en la ruptura co-traduccional de las glicoproteínas de la envuelta viral pero es importante para su eficiente maduración (Shi y cols., 2004).



Esta proteína transmembrana tiene cinco dominios: los dominios I, III y V son hidrofóbicos y atraviesan la membrana del RER en donde la poliproteína M empieza a traducirse, y los dominios hidrofílicos II y IV (Shi y cols., 2006).

Aunque no se conoce en detalle la función que desempeña, se considera que NSm es una proteína de andamiaje ya es importante para los procesos de ensamblaje y morfogénesis viral (Kuismanen y cols., 1982, Fontana y cols., 2008). Por un lado, tiene una señal de retención que le permite acumularse en el Golgi (que es la zona de ensamblaje viral) donde co-localiza con Gn y Gc. Por otro lado, mientras que NSm está

presente en las partículas virales inmaduras y orgánulos de replicación (Fontana y cols., 2008), desaparece de la estructura final en los viriones, lo que es un comportamiento típico de las proteínas de andamiaje (Steven y cols., 2005). Sólo su porción amino terminal es esencial para el virus (Pollitt y cols, 2006).

Proteína de la nucleocápsida, NC.

La proteína de la nucleocápsida (NC) es una proteína multifuncional que además de encapsidar los segmentos genómicos y antígenómicos, interacciona consigo misma para formar oligómeros, interacciona con L y con el carboxilo terminal de las glicoproteínas para estabilizar la estructura del virión, y con proteínas celulares tales como la proteína de unión a poli-A. Se cree que también juega un papel importante en la regulación del cambio de L de su actividad de transcripción a replicación (Shi y cols., 2005; Eifan y Elliott, 2009).

En BUNV NC forma multímeros (Leonard y cols., 2005; Mohl y Barr, 2009) en los que ambos extremos, el amino y el carboxilo, están involucrados. Esto sugiere que las interacciones son cabeza-cabeza y cabeza-cola.

La estequiometría de unión a RNA es de 12 nt por monómero (Mohr y Barr, 2009). Esencial para la unión de la proteína al ácido nucleico es una arginina conservada en la posición 94, con la contribución de una arginina en el aminoácido 40 y una lisina en el 50 (Walter y cols., 2011).

Proteína no estructural NSs.

Es una proteína no estructural, codificada por el segmento S, que expresan la mayoría de los virus del género adicionalmente a NC. La traducción se inicia desde un ORF solapante alternativo que empieza hacia el extremo 5' del mensajero.

Es una proteína hidrofóbica que se localiza en el núcleo así como en estructuras granulares en el citoplasma (Thomas y cols., 2004).

Comparte cierta homología en secuencia y función con la proteína pro-apoptótica Reaper de *Drosophila* (Colon-Ramos y cols., 2003). Tiene múltiples funciones en la replicación e interacciones con la célula hospedadora. Es un regulador negativo de la replicación de la polimerasa viral afectando negativamente a su actividad (Weber y cols., 2001, Blakqori y cols, 2007). No es esencial para la viabilidad del virus (Brigden y cols., 2001; Blakqori y Weber, 2005; Ogawa y cols., 2007) pero afecta a su citopatogenicidad (Sziemiel y cols., 2012).

NSs es el factor de virulencia y antagonista del sistema de interferón (IFN) (Soldan y cols., 2005), por lo que virus mutantes deficientes en NSs están muy atenuados en ratones y células de mamífero competentes para la respuesta de IFN tipo I (α y β) (Blakqori y cols., 2007).

NSs inhibe de forma global la transcripción de mensajeros celulares por la RNA polimerasa II DNA dependiente (RNAPII). Esto tiene un fuerte efecto inhibitorio en el promotor de β -IFN, previniendo así la activación de las respuestas inmunes innatas.

También se ha visto que interfiere con la síntesis de proteínas en sistemas de traducción *in vitro* (Hart y cols., 2009). Por todo ello, se puede decir que NSs contribuye al prominente silenciamiento celular que se observa en muchas líneas celulares de mamífero por inhibición de la transcripción y también de la traducción.

En células de insecto se conoce muy poco sobre la función de NSs. Como ocurre en células de mamífero deficientes en IFN, NSs no es esencial para la viabilidad y eficiencia de crecimiento en células de mosquito (Blakqori y cols., 2007). Tampoco tiene efecto en la RNAPII (Verbruggen y cols., 2010), ni es esencial para el establecimiento de infecciones persistentes (Szemiel y cols., 2012).

No se ha encontrado función de la proteína NSs en el ciclo infectivo del virus en células de invertebrado. Sin embargo, podría atribuírsele un posible papel en la infección en el contexto del organismo completo. De hecho, recientemente se ha visto que NSs es importante en la transmisión del virus en la naturaleza, ya que está involucrada en la diseminación del virus desde el intestino medio hacia las glándulas salivares del mosquito infectado (Szemiel y cols., 2012).

Todos estos datos parecen apuntar a que el papel biológico predominante de NSs sería la inhibición del sistema IFN de tipo I en hospedadores mamíferos, una medida que aseguraría alcanzar una alta viremia que incrementaría la probabilidad de infección de los mosquitos hematófagos. A su vez, en los mosquitos infectados sería importante para la transmisión del virus al siguiente hospedador vertebrado.

3.7. Ciclo de replicación.

Entrada

La interacción primaria entre una partícula viral y la célula se media por una o ambas glicoproteínas que se unen al receptor celular. Los receptores específicos de orthobunyavirus aun no han sido identificados, aunque el amplio rango de hospedadores sugiere que son moléculas ubicuas, al menos las que permiten la unión inicial.

Gc se ha identificado como la principal proteína involucrada en la entrada en células de vertebrado, mientras que Gn sería más importante en células de mosquito (Ludwig y cols., 1989 y 1991; Plassmeyer y cols., 2005). Sin embargo sigue siendo una cuestión sin aclarar, ya que otros autores indican que es Gc la que media el anclaje en ambos tipos de células (Kingsfor y cols., 1983; Sundin y cols., 1987; Hacker y cols., 1995; Hacker y Hardy, 1997).

Experimentos realizados con el OROV demuestran que el virus entra vía endocitosis por vesículas tapizadas de clatrina y que se liberan al citoplasma cuando, por acidificación del pH, se produce la fusión de la membrana viral con la del endosoma (Santos y cols., 2008). En la figura 9 se representa un esquema explicativo.

Transcripción y traducción.

Después del desenvolvimiento del virión en el citoplasma, los segmentos del orthobunyavirus se transcriben a mensajeros virales (transcripción primaria) por la polimerasa viral L. La transcripción es un proceso mediado por cebadores, utilizándose para ello pequeños oligonucleótidos correspondientes a los extremos “cap” 5’ de mensajeros celulares. Estos cebadores se generan gracias a la actividad endonucleasa de L (Jin y Elliott, 1991 y 1993).

En el proceso se utilizan mensajeros maduros del citoplasma y por ello la replicación viral no es sensible a actinomicina D o a α -amanitina, ya que no depende de la formación de nuevos mensajeros en el núcleo.

La transcripción de los bunyavirus es única dentro de los virus RNA de polaridad negativa, ya que la síntesis de mensajero viral funcional requiere de la síntesis concomitante proteína (Abraham y Pattnaik, 1983; Pattnaik y Abraham, 1983; Vialat y Bouloy, 1992). Tanto *in vivo* como *in vitro*, en ausencia de síntesis proteica sólo se producen transcritos pequeños. Sin embargo, si a la reacción de transcripción *in vitro* se añade un lisado de reticulocitos de conejo se sintetizan mensajeros de longitud completa.

El requerimiento traduccional para la generación de mensajeros no se encuentra a nivel de iniciación sino en que previene la terminación prematura de la transcriptasa. El modelo que se maneja es que en ausencia de unión a ribosoma y de traducción de proteínas, los mensajeros nacientes pueden aparear con su molde y, por lo tanto, impiden la progresión de la enzima transcriptasa (Raju y Kolakofsky, 1987).

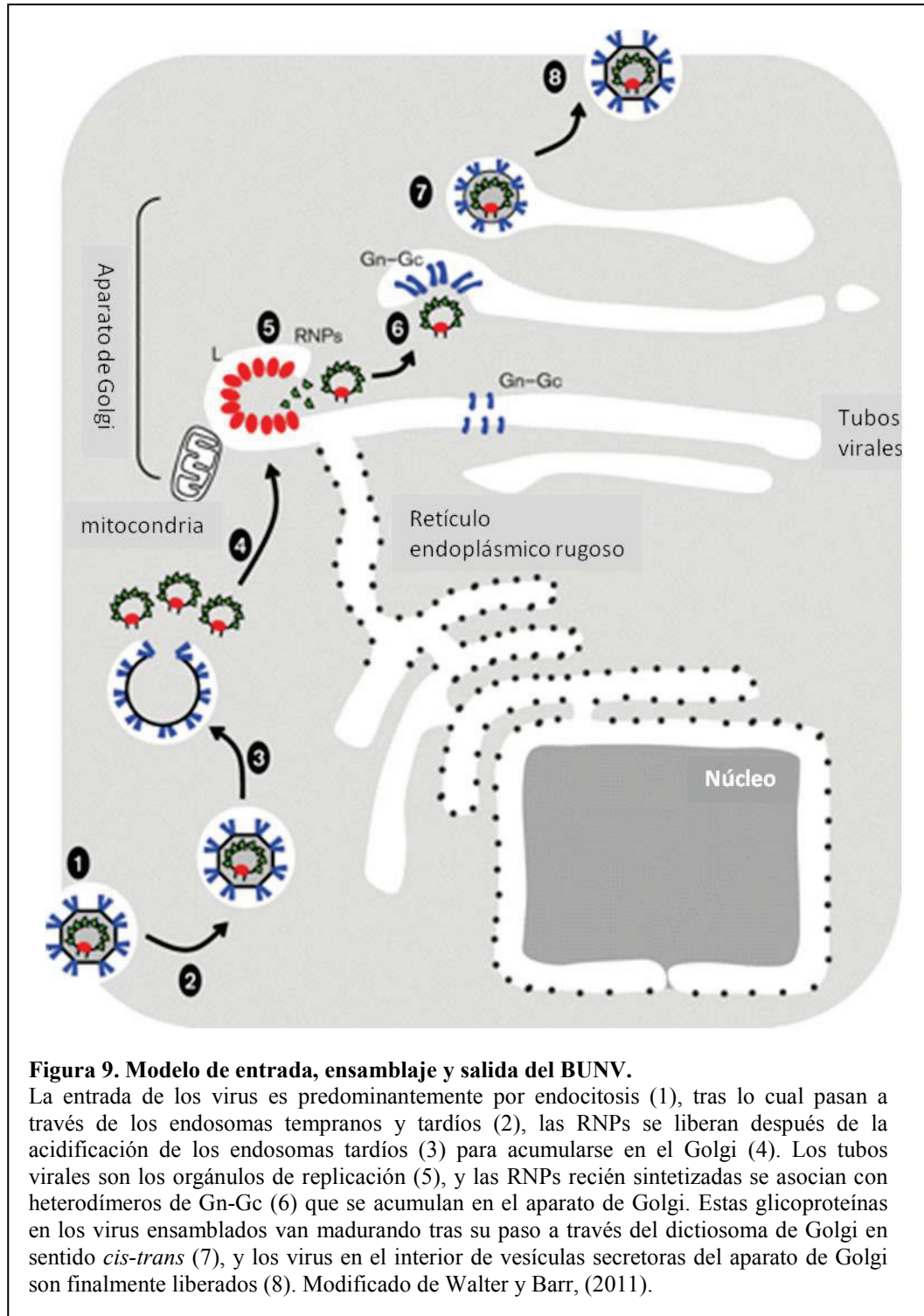


Figura 9. Modelo de entrada, ensamblaje y salida del BUNV.

La entrada de los virus es predominantemente por endocitosis (1), tras lo cual pasan a través de los endosomas tempranos y tardíos (2), las RNP se liberan después de la acidificación de los endosomas tardíos (3) para acumularse en el Golgi (4). Los tubos virales son los orgánulos de replicación (5), y las RNP recién sintetizadas se asocian con heterodímeros de Gn-Gc (6) que se acumulan en el aparato de Golgi. Estas glicoproteínas en los virus ensamblados van madurando tras su paso a través del dictiosoma de Golgi en sentido *cis-trans* (7), y los virus en el interior de vesículas secretoras del aparato de Golgi son finalmente liberados (8). Modificado de Walter y Barr, (2011).

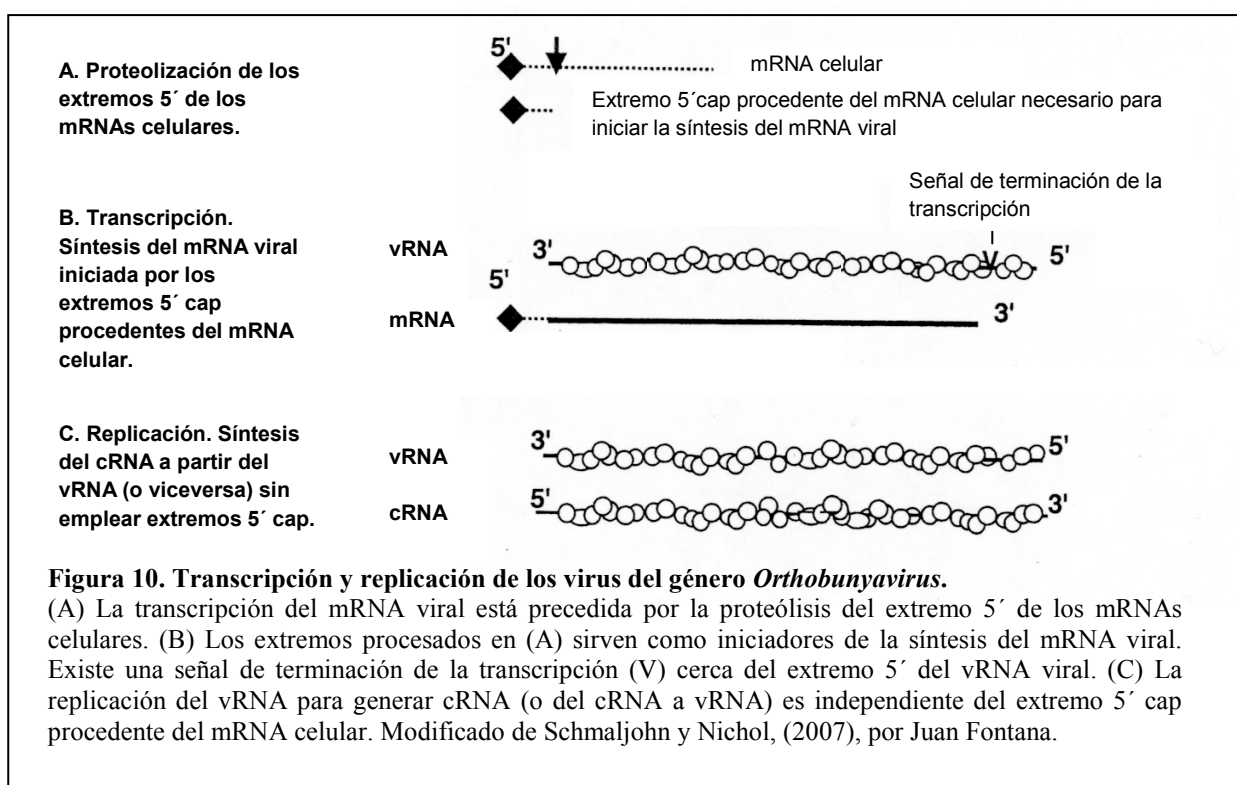
La síntesis de mensajeros termina sobre 40 nt (en M y L) o 100 nt (en S) antes del final del molde RNA genómico (Patterson y Kolakofsky, 1984; Jin y Elliott, 1993). Estas secuencias de terminación de la transcripción han sido identificadas para los segmentos S y L (Barr y cols., 2006).

Para la traducción proteica eficiente son necesarias la presencia de “caps” 5’7-metilguanosina y una cola de poli-adenosina (poli-A) en posición 3’. En el modelo de

bucle cerrado (“closed loop”) ambos extremos del mensajero están en íntimo contacto gracias a la unión a diferentes proteínas (Hentze, 1997), esto mejoraría la traducción ya que aumenta la probabilidad de que las subunidades de los ribosomas que se van liberando de los extremos 3’ de los mensajeros virales se reenganchen rápidamente con el extremo 5’ para iniciar otra ronda de síntesis proteica (Blakqori y cols., 2009).

Replicación del genoma.

Para la replicación de los genomas RNA de polaridad negativa, se necesita un RNA complementario de polaridad positiva, el antígenoma. Esta molécula se diferencia de los mensajeros en que no lleva la extensión del cebador en posición 5’ y que el final en 3’ se extiende completamente hasta el final del extremo 5’ del molde de RNA genómico. Para la replicación, sólo son necesarias las proteínas virales L y NC (Dunn y cols., 1995).



No se sabe cómo se controla el cambio entre transcripción y replicación pero, por analogía con otros virus RNA negativos, probablemente el nivel de proteína NC sintetizada juegue un papel importante. Existen dos eventos clave que provocan la diferencia entre transcripción y replicación: el requerimiento de cebadores para la iniciación y el reconocimiento de la señal de terminación del mensajero. Es también

posible que existan diferentes formas de la polimerasa viral que vengan dadas por la asociación diferencial de proteínas celulares. Estas diferentes formas podrían llevar a cabo los diferentes modos para la producción de RNA. Otra posible explicación es que al encontrarse los antigenomas únicamente ensamblados en RNPs en las células infectadas, la encapsidación del antigenoma naciente puede prevenir su interacción con el molde y, por lo tanto, superar la señal de terminación funcional en el mensajero (Elliott y Blakqori, 2011).

3.8. Ensamblaje: Factorías virales.

Normalmente la replicación viral y el ensamblaje están confinados dentro de compartimentos específicos intracelulares llamados factorías virales, viroplasmos o inclusiones virales. Se cree que esto provee una plataforma física para concentrar los nuevos genomas y proteínas involucrados en la replicación y ensamblaje, aumentándose la eficiencia de producción viral. La formación de estos sitios especializados de replicación puede implicar una reorganización exhaustiva de citoesqueleto celular y compartimentos de membranosos (Novoa y cols., 2005 a; Netherton y cols., 2007; de Castro y cols., 2012).

Los virus requieren un número considerable de proteínas y otros factores de la célula hospedadora que facilitarían la replicación y ensamblaje viral. Hay evidencias que dicen que esas proteínas son transportadas a las factorías. Muchas de ellas son reclutadas activamente por proteínas virales específicas (Netherton y Wileman, 2011).

Estas factorías virales, en donde el virus se ensambla y/o replica, son un ejemplo de interacción compleja entre factores virales y celulares, facilitan el aprovechamiento de determinadas rutas celulares por parte de la maquinaria viral y la formación de las numerosas interacciones necesarias gracias a la concentración de los distintos elementos virales y celulares en el área de la factoría (Novoa y cols., 2005 a; Wileman, 2007).

En nuestro laboratorio se ha caracterizado la ruta morfogenética del BUNV en líneas celulares de mamífero en cultivo susceptibles a la infección. Los virus se ensamblan en membranas del aparato de Golgi, en donde se organiza la factoría viral por el reclutamiento y modificación de orgánulos, como mitocondrias y RER (Salanueva y cols., 2003; Novoa y cols., 2005 b; Fontana y cols., 2008). Las glicoproteínas virales se acumulan allí y en células de mamífero producen una progresiva vacuolización (Cash, 1982).

Las partículas virales inmaduras recién formadas mediante gemación o “budding” en las cisternas *cis* del Golgi (virus intracelular tipo I, VI) van sufriendo un cambio conformacional en las glicoproteínas de la envuelta según van atravesando las cisternas

del Golgi hacia su parte *trans*. Como resultado de estas modificaciones, producidas por distintas glicosidasas y glicosil-transferasas residentes que provocan la adquisición de azúcares complejos, se forman los virus intracelulares tipo II (VII). Por esto, las formas inmaduras son completamente sensibles a la endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (endoH), enzima que corta azúcares de tipo simple o inmaduro, mientras que los VII son parcialmente resistentes. Posteriormente estos intermediarios viajan por la ruta exocítica hasta su salida, momento en el cual sufrirán un último cambio para convertirse en virus extracelulares maduros totalmente infectivos (VE) (Novoa y cols., 2005 b), que se caracterizan por exhibir una corona formada por las espículas de la envuelta viral. En la figura 11 se muestra un resumen de la factoría viral del BUNV y su ruta morfogenética en células de mamífero.

También en el interior de las factorías virales también hemos identificado los complejos replicativos del BUNV en el dominio globular de los orgánulos de replicación. Los orgánulos de replicación son unas estructuras tubulares que tienen un dominio globular en un extremo, estos tubos están abiertos al citoplasma. NC se encuentra principalmente en la cabeza (dominio globular) (Fontana y cols., 2008). La proteína NSm está en los tubos y formas virales intermediarias pero no en las partículas virales maduras, sugiriendo que juega papel de andamiaje en el ensamblaje. Los tubos contienen proteínas celulares como miosina y actina. Estos tubos unen espacialmente orgánulos celulares, como mitocondrias al aparato de Golgi, e interaccionan con los diferentes intermediarios virales. De esta forma, se cree que proveerían una ruta para los factores celulares que se necesitan para la replicación del genoma y las etapas iniciales del ensamblaje del virus (Fontana y cols., 2008).

Se ha propuesto un modelo en el que las RNPs son transportadas desde los sitios de replicación en las cabezas de los tubos hasta el citoplasma (figura 12), donde se condensan en membranas del Golgi modificadas por la inserción de Gc y Gn promoviendo la gemación de partículas inmaduras. Las colas citoplásmicas de ambas glicoproteínas jugarían un papel importante de anclaje de las RNPs (Shi y cols., 2007).

Se cree que ensamblaje y maduración de orthobunyavirus ocurre de forma similar en células mamífero e insecto vector. Sin embargo, mientras que en células de mamífero se observa un efecto citopático extremo que provoca la muerte celular, las células de mosquito son capaces de tolerar esta gran perturbación de la arquitectura celular y mantienen su viabilidad, alcanzando un estado de infección persistente (Borucki y cols., 2002). Estos mecanismos de resistencia están aún por esclarecerse.

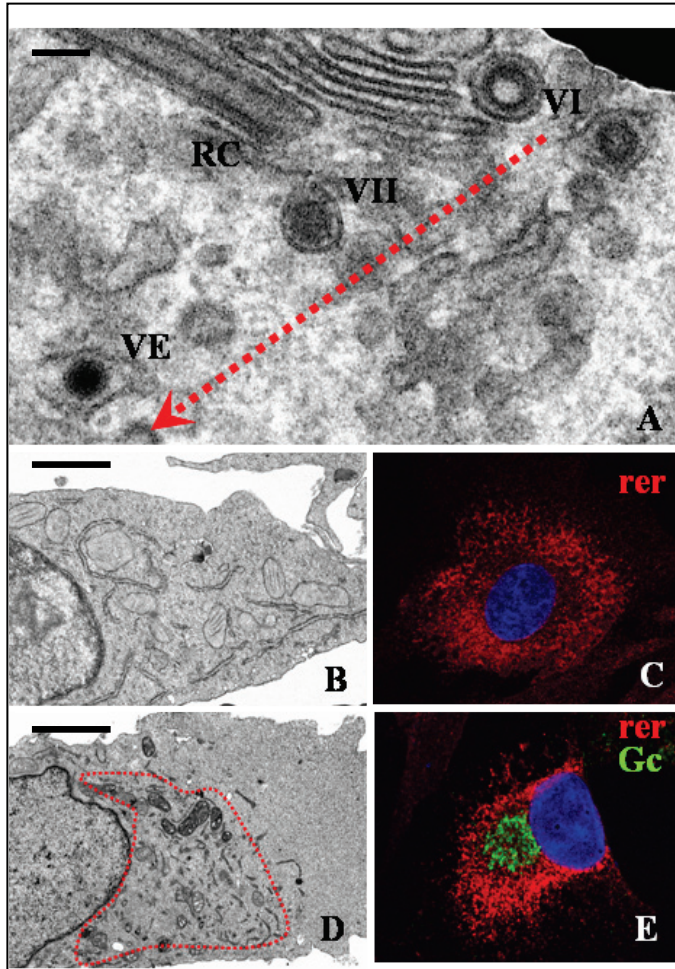


Figura 11. Resumen de la factoría viral y ruta morfogenética del BUNV en células de mamífero.

(A) Ruta morfogenética del BUNV. Los virus ensamblados en *cis* Golgi pasan a través del dictiosoma hacia su parte *trans*. Durante este tránsito las partículas virales intracelulares tipo I (VI) maduran y se transforman en partículas virales tipo II (VII), los viriones (VE) tienen infectividad completa y una corona visible de espículas. (B) Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de célula de mamífero no infectada. (C) Microscopía de fluorescencia de una célula de mamífero no infectada. (D) TEM de célula de mamífero infectada, la factoría viral se señala con una línea discontinua. (E) Microscopía de fluorescencia de una célula de mamífero infectada. La zona de la factoría viral se visualiza en verde por la acumulación de Gc. Barras: 100 nm en A, 1 micrómetro (μ m) en B y D.

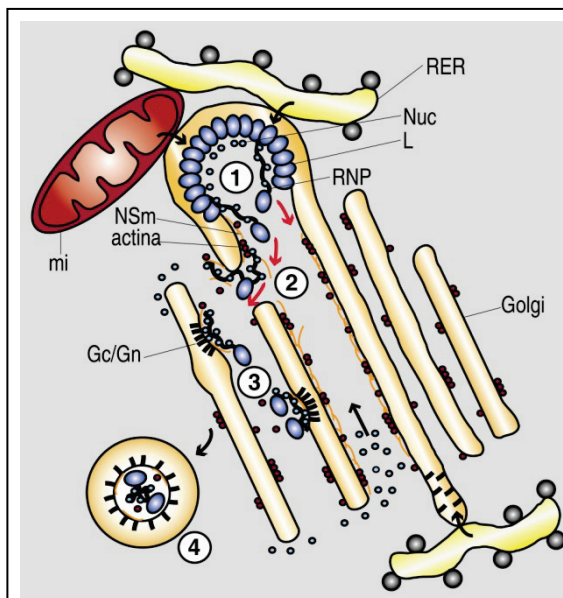


Figura 12. Modelo de funcionamiento de los orgánulos de replicación (tubos virales) del BUNV en células de mamífero.

(1) Síntesis de nuevo RNA viral y formación de las RNPs. (2) Traslado de las RNPs virales a la zona de ensamblaje. (3) Formación de arcos de maduración que generarán los nuevos virus. (4) Partícula viral lista para los procesos de maduración y secreción. mi: mitocondria. Fontana y cols., (2008).

3.9. Evolución.

Es sabido que las RNA polimerasas RNA dependientes tienden a la introducción de mutaciones ya que no tienen actividad de corrección de errores. Esto conlleva a una acumulación progresiva de mutaciones que llevan a la alta heterogeneidad genética que se encuentra en la población de RNA viral (Drake y Holland, 1999; Moya y cols., 2000).

De acuerdo con esto, existen estudios de generación de oligonucleótidos por la ribonucleasa (RNAsa) del bacteriofago T1 en aislados de LACV que indican que no existen dos aislados iguales (Klimas y cols., 1981). Sin embargo, la secuenciación directa de LACV aislados del cerebro de niños que murieron en los años 1960, 1978 y 1993 demostró que había entre ellos mínimas diferencias, en tan sólo 51 nt. Esta aparente estabilidad genética podría indicar que sólo algunas variantes genéticas son virulentas para humanos (Huang y cols., 1997).

Hay estudios que indican que en arbovirus como el virus Dengue (DENV), la acumulación de mutaciones es mayor en células de mamífero que en células de mosquito (Vasilakis y cols., 2009).

Otra fuente de evolución en bunyavirus es el reordenamiento de segmentos, que es el intercambio de moléculas completas de RNA entre virus de genoma segmentado genéticamente relacionado. Ocurre por co-infección con los virus parentales. Este fenómeno sólo es posible en bunyavirus relacionados e incluso algunas combinaciones son genéticamente incompatibles (Pringle y cols., 1984; Rozhon y cols., 1981). La base de esta restricción en el reordenamiento podría ser la incompatibilidad en algunas interacciones proteína-proteína y/o proteína-ARN.

La reorganización genómica puede ocurrir también en mosquitos al ingerir dos tipos de virus diferentes en la misma o diferente comida (Beaty y cols., 1985; Borucki y cols., 1999). Se han visto virus con mutaciones por reordenamiento en glándulas salivares y ovarios de mosquito. Estos pueden ser transmitidos transovaricamente y por picadura (Reese y cols., 2008; Nunes y cols., 2005). Este fenómeno puede ser de vital importancia considerando la posibilidad de generación de nuevos virus patógenos emergentes.

Por ejemplo, los análisis del genoma del NGAV, asociado a fiebre hemorrágica en el este de Africa, han mostrado que los segmentos L y S son derivados de BUNV mientras que el M proviene del virus Batai (Gerrard y cols., 2004; Yanase y cols., 2006; Briese y cols., 2006). En este caso el nuevo virus generado por reorganización del genoma provoca fiebre hemorrágica, mientras que para ninguno de los parentales se ha reportado esta grave sintomatología.

En los orthobunyavirus también existe cierta plasticidad genética. Esto puede verse en la existencia de mutantes que revierten mutaciones anteriores mediante la delección de los aminoácidos mutados (Pollitt y cols., 2006) o por la escisión de secuencias insertadas (Shi y cols., 2010). No se conoce el mecanismo de acción de estos fenómenos y actualmente está bajo estudio.

3.10. Silenciamiento de proteínas celulares.

Los orthobunyavirus y bunyavirus en general, al igual que los virus de las familias *Picornaviridae*, *Flaviviridae* y *Caliciviridae*, inhiben la transcripción y traducción de proteínas en el hospedador. Aunque para las demás familias se han visto proteasas que atacan factores de transcripción y traducción, no se ha demostrado en bunyavirus (Elliott y Blakqori, 2011).

En células infectadas por BUNV se inhibe la fosforilación de la serina 2 del dominio citoplasmático de la RNAPII. Esto bloquea la síntesis de mensajeros del hospedador (Thomas y cols., 2004). Por sí sola, la proteína NSs puede activar este mecanismo. Esta interacciona con la proteína MED8 que es parte del complejo “Mediator” que asiste a la RNAPII en la transcripción (Leonard y cols., 2006). También puede influenciar en la estabilidad de la RNAPII en la etapa de elongación (Verbruggen y cols., 2010). Así como llevar a la degradación de la RNAPII mediada por proteasoma. Todo ello presenta similitudes a la respuesta celular frente al daño del DNA.

La inhibición de la RNAPII afecta no solo a promotores constitutivamente activos, como el promotor inmediatamente temprano del virus del simio 40 (SV40), sino también a promotores inducibles, como el promotor de β -IFN. Estos mecanismos, por tanto, llevan a la inhibición tanto de la síntesis de proteínas del hospedador como a la del sistema del IFN tipo I, lo que sería un arma para evadir el sistema inmune del hospedador vertebrado.

Sin embargo, en las células infectadas de mosquito no se produce la inhibición ni de la transcripción ni de la traducción (Hart y cols., 2009).

3.11. Apoptosis.

En organismos pluricelulares, la eliminación deliberada de células dañadas, que proliferan descontroladamente o que no se necesitan más durante el desarrollo tiene una importante función reguladora en el control del crecimiento y de la infección. Varios estímulos, como el estrés oxidativo, la radiación ultra-violeta (UV) e infecciones microbianas pueden inducir cascadas de muerte celular programada o apoptosis. Estas

cascadas, que se pueden originar tanto en la superficie celular (proteína Fas), como en el núcleo (proteína p53) o mitocondrias (familia de proteínas Bcl-2), desbloquean una serie de procesos que al final llevan a la autodestrucción celular.

La mayor parte de esta autodestrucción la llevan a cabo proteasas de la familia de las caspasas y nucleasas activadas (Widlak y Garrard, 2005; Best, 2008). La formación de cuerpos de inclusión, fragmentación de la cromatina, pérdida de integridad mitocondrial y cambios en la polarización de la membrana celular son signos de apoptosis.

Diferentes virus pueden ser activadores o inhibidores de la apoptosis. En general, la inhibición se ve en virus que producen infecciones persistentes (como el virus del papiloma humano tipo 16), mientras que virus con infección lítica a menudo inducen muerte celular (como el virus de la Influenza A) (Hinshaw y cols., 1994; Filippova y cols., 2007).

Los orthobunyavirus pueden establecer infecciones líticas o persistentes dependiendo de la célula hospedadora. Las células de insecto se infectan permanentemente y la viabilidad de la célula no se ve afectada. En contraste, en células de mamífero estos virus llevan a cabo un ciclo replicativo lítico que provoca la muerte celular. LACV, OROV, AKAV y el virus Aino inducen apoptosis (Pekosz y cols., 1996; Lim y cols., 2005; Acrani y cols., 2010). De hecho, como ya se ha comentado anteriormente, NSs tiene similitud de secuencia y función con la proteína pro-apoptótica Reaper de *Drosophila*. Tanto Reaper como NSs se unen e inhiben el regulador anti-apoptótico Scythe (Colon-Ramos y cols., 2003).

En contraste con lo anteriormente descrito, la proteína NSs del BUNV tiene función anti-apoptótica (Kohl y cols., 2003). Esto se cree que es debido a su habilidad para bloquear la señalización del factor regulador de IFN 3 (IRF3), una ruta que no solo induce la transcripción de genes IFN sino que también activa la muerte celular programada.

Las diferentes capacidades de los orthobunyavirus para inducir o bloquear la apoptosis muestran que, en conjunto, la apoptosis no es un factor importante en su ciclo de vida. De hecho, la liberación de virus no se ve significativamente influenciada por la apoptosis (Pekosz y cols., 1996; Bridgen y cols., 2001; Blakqori y Weber, 2005). Es probable que la inducción o inhibición de la apoptosis sea un efecto colateral de estos virus (como el LACV o el BUNV) al bloquear la traducción de proteínas y la inducción del IFN.

3.12. Infección lítica versus infección persistente.

Como ya se ha explicado previamente, los orthobunyavirus se mantienen en la naturaleza a través de ciclos complejos intra e inter-especie, en los que están involucrados hospedadores invertebrados y vertebrados. En ambos sistemas, las células se transforman en factorías moleculares que se reprograman para producir y liberar la progenie viral. Sin embargo, la infección puede tener diferentes desenlaces para las células.

Los mosquitos, y sus líneas celulares, se infectan persistentemente y liberan partículas virales sin mostrar signos evidentes de citopatogenicidad. Sin embargo, la mayoría de células de mamífero sucumben rápidamente a la infección y a menudo se asocia con enfermedades, que pueden ir de leves a severas, en animales y humanos (Elliott y Blakqori, 2011).

Definir las bases moleculares de las diferencias observadas en los dos sistemas contribuiría enormemente a entender funciones celulares y a identificar nuevas dianas para estrategias antivirales.

El sistema inmune de vertebrados rápidamente localiza y hace frente a infecciones microbianas a nivel celular, intenta reducir la dispersión de los agentes infecciosos hasta que pueda organizarse una respuesta inmune específica. Las moléculas que comúnmente forman parte de virus y bacterias (PAMPs, del inglés “Pathogen-Associated Molecular Patterns”), como ácidos nucleicos o componentes de la pared celular se perciben como “no propios” por diferentes receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés “Pattern Recognition Receptors”). Estas proteínas sensores pueden estar asociadas a membrana o ser citoplásmicas. En el caso de los virus, las PAMPs suelen ser derivadas de ácidos nucleicos (Elliott y Blakqori, 2011).

Las células inmunes expresan receptores tipo Toll (TLRs, del inglés “Toll Like Receptors”) que son proteínas transmembrana localizadas en la superficie celular y estructuras internas como endosomas, lisosomas y fagosomas (Iwasaky y Medzhitov, 2004) que reconocen patógenos externos a la célula o que han sido internalizados por endocitosis o fagocitosis. Los TLRs que detectan virus se activan por dsRNA (como el TLR3), ssRNA (los TLRs 7 y 8) y DNA no metilado (el TLR 9) (Lund y cols., 2003 y 2004; Tabeta y cols., 2004).

Por otro lado, células no inmunes como los fibroblastos pueden reconocer virus invasores mediante PRRs citoplasmáticos como la RNA helicasa RIG-I (proteína citoplásmica inducible por el ácido retinoico-I), MDA5 (proteína asociada a diferenciación de melanoma-5) o STING (gen estimulador de interferon) (Andrejeva y cols., 2004; Yoneyama y cols., 2004, Ishikawa y cols., 2009). RIG-I y MDA5 han evolucionado para detectar distintas especies RNA.

La activación de RIG-I viene dada por la detección simultánea de dos características diferentes propias de los RNAs virales de cadena sencilla: un grupo trifosfato en el extremo 5' y regiones de doble cadena (Schmidt y cols., 2009). La activación de MDA5 se produce por grandes estructuras de RNA en forma de red (Pichlmair Y cols., 2009). Por experimentos con ratones “knock out” con los genes de RIG-I o MDA5 silenciados se demuestra que la mayoría de virus RNA son reconocidos por uno u otro sensor. Por ejemplo, RIG-I es importante en el reconocimiento de los paramyxovirus, virus de la estomatitis vesicular e influenza, y MDA5 detecta picornavirus (Kato y cols., 2006). Para el reconocimiento de algunos virus parece que ambos son importantes, para el de otros son redundantes (Takeuchi y Akira, 2009). El receptor STING que la respuesta innata inmune a DNA metilado citoplasmático, se ha visto que es esencial para limitar la infección del virus Herpes Simplex 1 en ratón (Ishikawa y cols., 2009).

La unión de los PAMPs con sus correspondientes PRRs activan diferentes cascadas de señales que eventualmente pueden converger para inducir la expresión de IFN de tipo I (α y β) estableciendo un estado antiviral (Randall y Goodbourn, 2008).

Los IFNs son citoquinas secretadas que actúan de forma autocrina y paracrina. Después de la unión a los receptores de IFN, situados en la superficie celular, se activa la cascada de señalización JAK-STAT que resulta en la expresión de genes estimulados por IFN (ISGs, del inglés “IFN Stimulated Genes”), muchos de los cuales tienen función antiviral. Algunos de los ISGs, como la proteína quinasa R (PKR), RNasa L o las proteínas de resistencia a myxovirus (MX), se han estudiado en detalle pero para la mayoría de los ISGs no se posee suficiente conocimiento.

La PKR activada (que es desencadenada por la existencia de dsRNA, un producto de replicación que ocurre en muchas células infectadas por virus) (Randall y Goodbourn, 2008) fosforila el factor eucariótico de iniciación de la traducción ($eIF2\alpha$), lo que lleva a un silenciamiento general de la síntesis proteica (Farrell y cols., 1977). El dsRNA activa también la 2'-5' oligoadenilato sintetasa (2-5 OAS) que produce pequeñas moléculas oligoadeniladas en 2'-5' que sirven como potentes activadores de la RNasa L. Una vez activada, esta RNasa L romperá indiscriminadamente ssRNAs virales y celulares, inhibiendo tanto la replicación viral como la síntesis proteica de la célula hospedadora (Randall y Goodbourn, 2008).

Un ejemplo más concreto es la inducción de la producción de β -IFN, que se produce por el reconocimiento por RIG-I del genoma RNA fosforilado en 5' del LACV (Verbruggen y cols, 2010). Esto lleva a las células a un estado antiviral que puede inhibir de forma efectiva la replicación del virus. La proteína citoplásmica MXA, una GTPasa de la superfamilia de la dinamina cuya expresión es estrictamente dependientemente de IFN, contribuye enormemente a la actividad antiviral (Haller y

Kochs, 2002). La ausencia de MXA aumenta la virulencia de LACV en ratones “knock-out”, y si se expresa MXA de forma constitutiva suprime la replicación de LACV en células transgénicas de mamífero e insecto (los cuales carecen naturalmente de la proteína) (Frese y cols., 1996; Gao y cols., 2010). La proteína MXA actúa secuestrando la proteína NC de LACV en el área perinuclear, lo que presumiblemente la hace inutilizable para la replicación viral (Kochs y cols., 2002). La depleción de NC afecta particularmente a la replicación de los segmentos genómicos M y L, mientras que la síntesis del segmento S permanece estable (Freese y cols., 1996). Otros bunyavirus que han mostrado ser sensibles a MXA son RVFV, virus Dugbe, virus Hantaan, virus Puumala y CCHFV (Frese y cols., 1996; Bridgen y cols., 2004). Adicionalmente, MXA también inhibe un gran rango de otros virus de genoma RNA y DNA, aunque el PAMP que confiere esta sensibilidad no ha sido aun identificado.

Los virus animales encuentran rutas para evadir el sistema IFN. Se han identificado una variedad de mecanismos: previniendo la producción de IFN tipo I, interfiriendo con la cascada de señalización que lleva a la expresión de ISGs o bloqueando la acción de ISGs específicos (Haller y cols., 2006). Por ejemplo, en células en cultivo infectadas con BUNV que han sido previamente tratadas con IFN se afecta más la replicación que si se tratan con IFN después de la infección. Además, el virus produce el bloqueo de la inducción de la transcripción de β -IFN en células infectadas. Es decir, el virus es sensible a IFN tipo I pero tiene mecanismos para bloquear su síntesis antes de su producción (Weber y cols., 2002, Streitenfeld y cols., 2003). Se ha visto que BUNV recombinantes que no expresan la proteína NSs son más sensibles a la expresión del IFN tipo I en células en cultivo y ratones. Si de forma complementaria se elimina el sistema de IFN tipo I, se restaura la replicación y virulencia a niveles comparables a la cepa salvaje del BUNV (Weber y cols., 2002). Este hecho también se ha comprobado en LACV (Blakqori y cols., 2007). Por esto, como ya se ha dicho anteriormente, NSs parece ser el principal antagonista del sistema IFN en orthobunyavirus pero de una forma general, es decir, inhibiendo la transcripción por la RNAPII de un bloque general de mensajeros (Thomas y cols., 2004).

En la naturaleza, existen mecanismos de defensa adicionales. Los virus también parecen ser protegidos de forma pasiva por la saliva del mosquito (Styer y cols., 2011), la cual contiene factores que modulan la producción de citoquinas (Zeidner y cols., 1999). Mediante infecciones experimentales con LACV en ratones y ardillas se ha comprobado que la eficiencia de infección es mayor cuando la inoculación produce de forma natural por mordedura de mosquito que cuando se realiza artificialmente con aguja (Borucki y cols., 2002). Esto también puede explicar como orthobunyavirus deficientes en NSs transmitidos a mamíferos pueden seguir propagándose haciendo frente al sistema inmune innato.

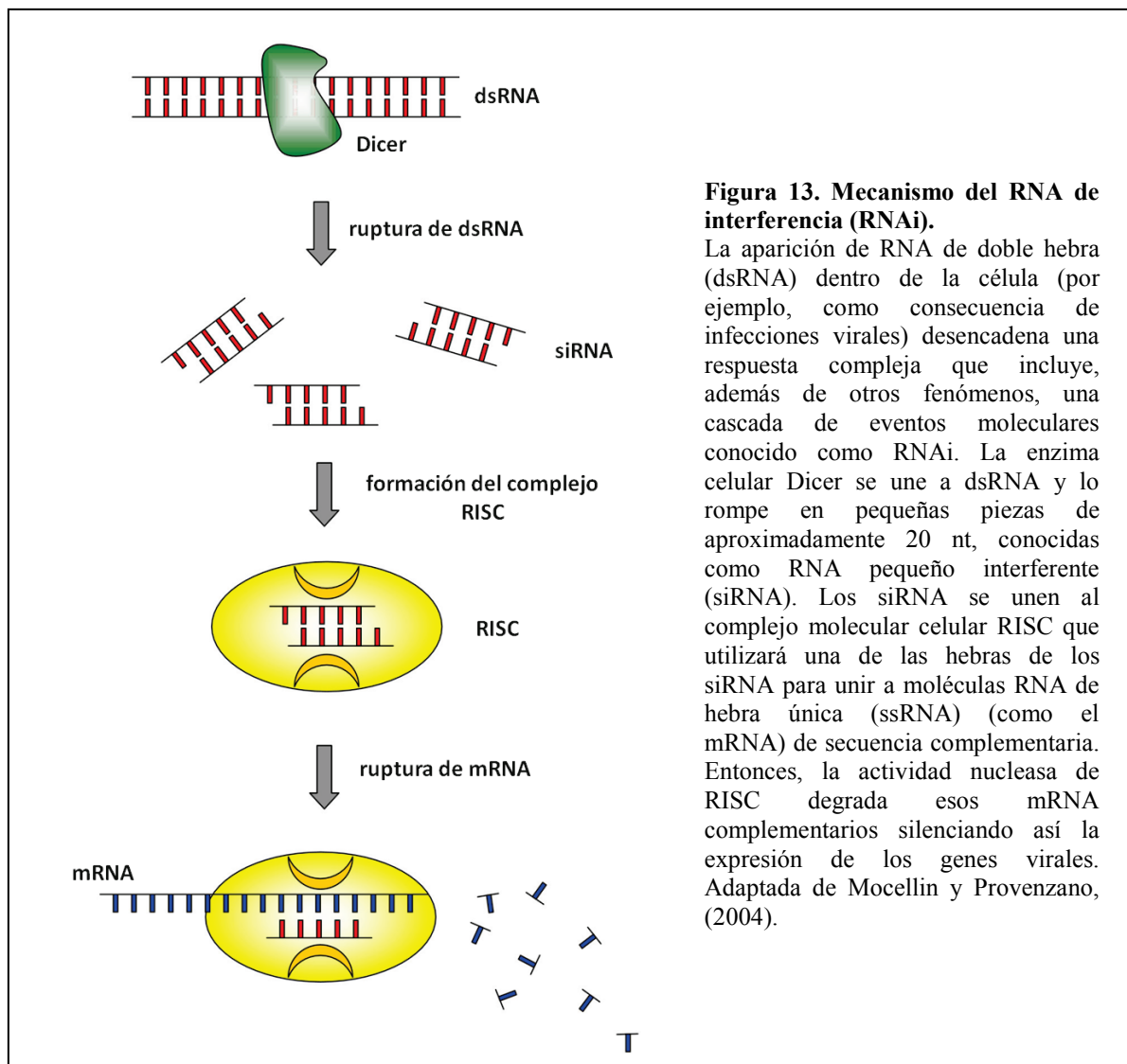
La inmunidad innata en insectos difiere de la existente en mamíferos y no se dispone de mucha información ya que su estudio es muy reciente. Los insectos no disponen del sistema IFN y confían su defensa principalmente al sistema de RNA interfente (RNAi) (figura 13) y a sistemas mediados por Toll para luchar contra virus y otras infecciones microbianas (Fragkoudis y cols., 2009).

El RNAi es un proceso por el cual dsRNA intracelulares son cortados en RNA de pequeño tamaño (siRNA, del inglés “Small Interfering RNA”). Estas son las moléculas efectoras que lideran el silenciamiento de RNA de secuencias complementarias. Este sistema puede funcionar por múltiples rutas: exo y endo RNA interferente pequeño (siRNA), microRNA (miRNA) y RNA inter-actuante con PIWI (piRNA) (Brackney y cols., 2010).

Se cree que la ruta exo-siRNA, cuyo silenciamiento se dispara por moléculas dsRNA de origen exógeno, es la que produce la principal respuesta antiviral en mosquitos (Sanchez-Vargas y cols., 2004). Esta ruta se inicia cuando la proteína Dicer2 se une a moléculas largas de dsRNA, que provendrían de intermediarios replicativos virales o estructuras secundarias de ssRNA, y las corta en siRNA de 20-22 nt. Estos siRNA son llevados por Dicer2 al complejo multiproteico RNA inductor de silenciamiento (RISC, del inglés “RNA Induced Silencing Complex”), que incluye la proteína Argonauta 2 (Ago2). El complejo RISC-siRNA identifica moléculas ssRNA complementarias a la secuencia guía, las cuales son degradadas por Ago2, ya que tiene actividad endonucleasa (Meister y cols., 2004; Okamura y cols., 2004).

En mosquitos y en líneas celulares persistentemente infectadas, existe una resistencia a la superinfección por orthobunyavirus homólogos o heterólogos altamente relacionados (Newton y cols., 1981; Beaty y cols., 1983). Esta protección no es eficaz frente a virus más lejanamente relacionados, por lo que parece ser un mecanismo dependiente de secuencia y se cree que es mediado por RNAi (Blakqori y cols., 2007). Las moléculas RNAs pequeños producidos en C6/36 tienen 24-28 nt, son por tanto más grandes que las que se encuentran normalmente en otras células de mosquito y moscas, de 21 nt (Brackney y cols., 2010; Scott y cols., 2010). Esto es debido a una función defectuosa de Dicer2 (Scott y cols., 2010). Se cree que en esta línea celular la resistencia a la superinfección por LACV estaría mediada por miRNA o piRNA, en lugar de por siRNA..

En la evasión por los bunyavirus del sistema RNAi en mosquito, puede ser importante el hecho de que el RNA viral se encuentra encapsidado con NC, inhibiendo así la formación de dsRNA y su exposición al citoplasma (Weber y cols., 2001). También en células de mosquito han sido identificadas sustancias tipo citoquinas importantes en la protección frente a arbovirus como el DENV (Kanthong y cols., 2010).



4. NUEVOS MÉTODOS DE MICROSCOPIA PARA EL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ENTRE VIRUS Y CÉLULAS.

El establecimiento de mapas moleculares en el entorno celular con la ayuda de técnicas de alta resolución, representaría un gran avance en el esclarecimiento de multitud de mecanismos implicados en las complejas interacciones entre virus y células. Para comprender las funciones celulares de las macromoléculas y sus interacciones en el entorno biológico nativo es imprescindible conocer la organización espacial y localización a nivel molecular (Robinson y cols., 2007).

Hasta el desarrollo de proteínas de fusión genéticamente clonables (“tags”) en el campo de la microscopía óptica, el estudio de interacciones entre proteínas u otros factores en el entorno celular se veía limitado al uso de técnicas de inmunomarcaje con anticuerpos en muestras previamente fijadas o al uso de sondas específicas permeables como el Mitotracker[®] (mitocondrias) o el Lysotracker[®] (lisosomas) en células vivas.

Posteriormente, el uso generalizado de “tags” clonables como la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés “Green Fluorescent Protein”) y sus derivados, junto con el avance técnico de los equipos de microscopía, han provocado una verdadera revolución científica (“the green revolution”) (Stearns, 1995) pudiéndose estudiar multitud de procesos dinámicos en células vivas. En los últimos años, se han desarrollado en microscopía óptica lo que se denomina microscopía de super-resolución, pudiendo alcanzar resoluciones del rango de 10-50 nm e incluso mayores (Galbraith y Galbraith, 2011). Un ejemplo de estas microscopías son PALM (del inglés, “Photoactivation Localization Microscopy”) (Lee y cols., 2012) y STORM (del inglés, “Stochastic Optical Reconstruction Microscopy”) (Pereira y cols., 2012) que se basan en la localización de moléculas emisoras individuales foto-activables con una precisión nanométrica. Actualmente se dispone de una variedad de estrategias de super-resolución, algunas de las cuales ya se están aplicando en el estudio de virus en células (Lee-Huang y cols., 2011; Lehmann y cols., 2011).

La microscopía óptica tiene ventajas obvias como la de permitir un barrido rápido de áreas grandes y heterogéneas en la muestra, y la de estudiar los procesos en células vivas. Sin embargo, la interpretación estructural de estos procesos dinámicos requiere información a mayor resolución. Para ello, la microscopía electrónica de transmisión (TEM) es una herramienta de gran valor y la técnica de elección cuando se quiere estudiar la ultraestructura celular a alta resolución.

Incluso en la actualidad, cuando se quiere localizar e identificar proteínas o moléculas concretas en las células se recurre al uso de anticuerpos conjugados con oro coloidal que, al microscopio electrónico, se visualizan como partículas muy electrón-densas y bien definidas. Esto conlleva una serie de desventajas como la pérdida de resolución debido al tamaño de los inmunocomplejos, la baja sensibilidad cuando se trata de epítopos escasos o enmascarados por interacciones *in vivo*, y las limitaciones procedentes de la necesidad de hacer llegar los anticuerpos a sus proteínas específicas, lo cual limita los marcajes a la superficie de secciones o a células permeabilizadas, lo cual no es compatible con la preservación de la estructura nativa.

La incorporación de marcadores clonables electrón-densos podría representar un verdadero avance en el campo de la microscopía electrónica, análogamente a lo que supuso la GFP para microscopía óptica. Un primer intento fue la conversión de “tags” fluorescentes en precipitados electrón-densos. Ejemplos de ello son el método GRAB

(del inglés, “GFP Recognition After Bleaching”) mediante el que se realizaron estudios del aparato de Golgi (Grabenbauer y cols., 2005) y miniSOG (del inglés, “mini Singlet Oxygen Generator”) por el que se hicieron estudios en mitocondrias (Shu y cols., 2011). En ambos, las proteínas fluorescentes son foto-activadas para que reaccionen con la diaminobencidina (DAB) que es oxidada y genera un precipitado denso a los electrones. En estas técnicas las muestras deben ser previamente fijadas químicamente y la señal electrón-densa obtenida es un precipitado difuso que no permite llegar a altas resoluciones.

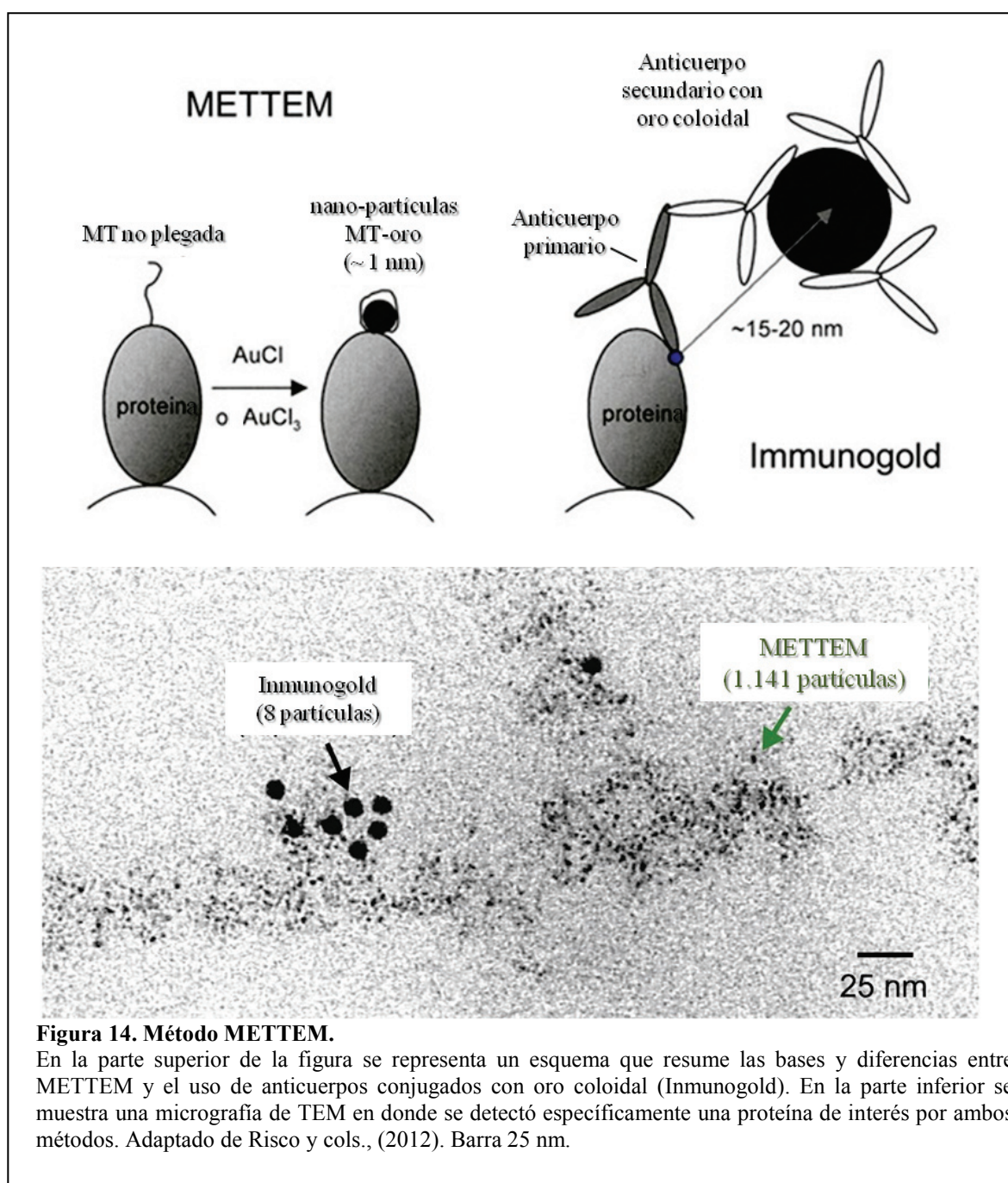
En nuestro laboratorio, durante los últimos 6 años, se ha puesto a punto y validado en primer método para la utilización de un “tag” clonable electrón-denso para TEM de células. Este método permite llegar a resoluciones moleculares y se ha denominado METTEM (del inglés “Metal Tagging TEM”). La etiqueta electrón-densa es la isoforma 1 de la proteína metalotioneína murina (MT). La MT es un quelante de iones metálicos que controla el almacenamiento e intercambio de metales biológicamente esenciales, como el Zinc y el Cobre, en células eucarióticas (Chan y cols., 2002). Es una proteína pequeña de 61 aminoácidos con 20 residuos cisteína que unen de forma muy eficiente átomos de elementos metálicos.

Estudios previos, desarrollados por C. Mercogliano y D. DeRosier de la Universidad de Brandeis (EEUU), demostraron que al tratar *in vitro* con sales de oro la MT fusionada genéticamente a otra proteína de interés se forma un “cluster” de tiolato de oro que, bajo el microscopio electrónico de transmisión, se visualizará como una partícula muy electrón-densa y definida de aproximadamente 1 nm de diámetro (Mercogliano y DeRosier, 2006 y 2007).

Siguiendo estas premisas, en nuestro laboratorio se utilizó por primera vez la MT como proteína electrón-densa de fusión *in vivo* con varias proteínas bacterianas, como AmiC, RecA, MBP y Hfq (Diestra y cols., 2009 a y b). Posteriormente se validó su uso como proteína de fusión en células eucariotas para el estudio de la biogénesis de los complejos replicativos del virus Rubella (Risco y cols., 2012). La fusión de proteínas con MT posibilita el uso de crio-métodos para TEM, minimizando el uso de fijadores y alcanzando una buena preservación de la ultraestructura celular. En la figura 14 se muestra un resumen comparativo del método METTEM con los inmunomarcajes con anticuerpos conjugados con oro coloidal.

Otro laboratorio ha utilizado de forma análoga la ferritina bacteriana (su monómero Ftn1), que reacciona con el hierro que se suplementa con el medio de cultivo de las células, (Wang y cols., 2011). Se pretendía evitar el uso de sales de oro, normalmente tóxicas para las células. Sin embargo, el tamaño de la partícula Ftn1 cargada con hierro es muy grande, de casi 12 nm, lo que lo invalida como técnica de elección si lo que se pretende es alcanzar una resolución molecular.

El método METTEM tiene gran potencial, ya que permite combinar identificación y localización específica de proteínas con los últimos avances en microscopía electrónica para mejorar la preservación ultraestructural, como la vitrificación a alta presión (HPF, del inglés “High Pressure Freezing”) (Dubochet, 2007), criosustitución (Noske y cols., 2008) u obtención de secciones vítreas (Leis y cols., 2009). En combinación con los nuevos microscopios electrónicos con haz de electrones de alta coherencia, y los programas informáticos de reconstrucción y mejora de la relación señal-ruido, se pueden obtener datos de alta resolución de complejos macromoleculares en células.



También se considera que será muy útil como ayuda en el acoplamiento de estructuras atómicas de proteínas en los mapas de densidad electrónica obtenidos mediante reconstrucción tridimensional (3D) a partir de cortes seriados o crio-tomografía electrónica (crioET). En resumen, se considera que combinando las distintas técnicas de preservación ultraestructural, con los nuevos microscopios electrónicos y los nuevos métodos de reconstrucción 3D y de mapeo molecular, conseguiremos obtener mapas 3D de los complejos macromoleculares en su entorno celular nativo, posibilitando así la comprensión de las interacciones moleculares responsables de las funciones celulares (Risco y cols., 2012).

Por último, la unión de la microscopía óptica, que permite el estudio a baja magnificación de procesos dinámicos en células vivas, con la microscopía electrónica, que aporta información de alta resolución, permitirá el estudio de procesos complejos en los sistemas biológicos. Esta unión se da en la microscopía correlativa (CLEM, del inglés “Correlative Light Electron Microscopy”) (Mironov y Beznoussenko, 2012).

Para CLEM, se venían utilizando moléculas bi-funcionales (fluorescentes y electrón-densas) como GFP (método GRAB) o miniSOG. Con la implementación del método METTEM se podrán utilizar construcciones genéticas con “tags” fluorescentes como GFP en tándem con MT (Risco y cols, 2012), o directamente utilizando derivados bi-arsénicos fluorescentes permeables a membrana como ReAsH (del inglés, “Resorufin based Arsenical Hairpin) o Flash (del inglés, “Fluorescein based Arsenical Hairpin Binder”) que se unen a motivos tetra-cisteína (Whitt y Mire, 2011), sobre MT.

En definitiva, el método METTEM ofrece grandes posibilidades que, junto con técnicas de crio-TEM y CLEM, permitirán entender en un futuro cercano multitud de mecanismos moleculares implicados en las complejas interacciones virus-células. Para conseguirlo, se necesitará generar nuevas construcciones que contengan los marcadores de interés, como GFP y MT (proteínas de fusión y virus recombinantes) y realizar estudios de actividad de las construcciones y de las condiciones de tratamiento con las sales de oro, antes de pasar a su uso en células y la visualización en CLEM y TEM.

OBJETIVOS

1. Caracterización del ciclo vital del BUNV en células de mosquito. Comparación con la infección en células de mamífero.
2. Caracterización de las factorías virales y ruta morfogenética del BUNV en células de mosquito. Comparación con las de células de mamífero.
3. Identificación y análisis de factores importantes involucrados en el diferente desenlace de la infección por BUNV en células de mamífero y mosquito. Infección lítica versus infección persistente.
4. Análisis de las funciones de la proteína viral NSm. Estudio comparativo en células de mamífero y mosquito.
5. Evaluación de la posibilidad de inserción de un “tag” de metalotioneina en la secuencia de la polimerasa viral del BUNV para la generación de virus recombinantes mediante genética reversa. Implicaciones para el futuro estudio mediante mapeo molecular y microscopía electrónica de alta resolución del complejo replicativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES DE TRABAJO.

1.1 Células y virus.

Células Vero: células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Se obtuvieron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, del inglés “American Type Culture Collection”), referencia CCL-81. Se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, del inglés “Dulbecco's Modified Eagle's Medium”) (Gibco®/Invitrogen™, Life Technologies Corp, Paisley, Reino Unido), con 4,5 g/l de glucosa, suplementado con aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EEUU), glutamina 200 mM (Sigma-Aldrich®), gentamicina 50 µg/ml (Sigma-Aldrich®), penicilina/estreptomicina 100 U/ml / 100 µg/ml y suero fetal bovino (FBS, del inglés “Fetal Bovine Serum”) al 10% (Biological Industries Ltd., Bert-Haemek, Israel).

Células BHK-21: fibroblastos de riñón de hámster (*Mesocricetus auratus*), Se obtuvieron en la ATCC, referencia CCL-10. Se crecieron en el mismo medio de cultivo que las células Vero, DMEM completo con 10% de FBS.

Células BSR-T7/5: células derivadas de BHK-21 que expresan establemente la polimerasa del virus bacteriófago T7 (Buchholz y cols., 1999), con lo que pueden expresar plásmidos que tengan el promotor de dicha polimerasa. Fueron donadas por el Dr. KK. Conzelmann (“Maxvon-Pettenkofer Institut”, Munich, Alemania). Se cultivaron en la modificación Glasgow del medio de cultivo de Eagle (GMEM, del inglés “Glasgow's Modified Eagle's Medium”) de Sigma-Aldrich®, suplementado con un 10 % de caldo triptosa fosfato (TPB, del inglés “Tryptose Phosphate Broth”) de Gibco®/Invitrogen™, un 10% de FBS y geneticina (Gibco®/Invitrogen™) a 20 µg/ml como agente de selección.

Células C6/36: Se obtuvieron en la ATCC, referencia CRL-1660. Esta línea celular proviene de un homogeneizado de larva del mosquito tigre (*Ae. albopictus*). Fueron crecidas en medio L-15 (Gibco®/Invitrogen™) suplementado con un 10 % de TPB y 10% de FBS.

Cepa original del virus Bunyamwera (BUNV): Se obtuvo en la ATCC, con referencia BR-87. La fuente original de virus son mosquitos *Aedes spp.* capturados en Bunyamwera, una zona inhabitada del oeste de Uganda, en 1943 (Smithburn y cols., 1946). En nuestro laboratorio esta cepa fue propagada en células C6/36, BHK-21 y Vero para generar sobrenadantes con partículas virales, es decir, “stocks” de trabajo.

rBUNL4-V5: BUNV recombinante que contiene el epítipo V5, una etiqueta molecular derivada de una pequeña región (Pk) presente en las proteínas P y V del paramixovirus del simio 5 (SV5) insertada en el sitio L4 (correspondientes al aminoácido 1935) de la polimerasa viral. Este recombinante fue generado mediante genética reversa (Shi y Elliott, 2009) por el laboratorio del Prof. Richard M. Elliott (“Centre for Biomolecular Sciences”, Universidad de St. Andrews, Reino Unido) y cedido por él a nuestro laboratorio. Todos los virus recombinantes descritos a continuación fueron cedidos también por el Prof. Richard M. Elliott.

rBUNM-NSm Δ 3: BUNV mutante que contiene una delección en la región codificante de NSm, en la secuencia correspondiente a los aminoácidos 354 al 400 de la poliproteína M (Shi y cols., 2006).

rBUNM-NSm Δ 4: BUNV mutante que contiene una delección en la región codificante de NSm, en la secuencia correspondiente a los aminoácidos 377 al 426 de la poliproteína M (Shi y cols., 2006).

rBUNM-NSm Δ 5: BUNV mutante que contiene una delección en la región codificante de NSm, en la secuencia correspondiente a los aminoácidos 410 al 456 de la poliproteína M (Shi y cols., 2006).

rBUNM-NSm-EGFP. BUNV recombinante que expresa la proteína EGFP unida a la proteína NSm (Shi y cols., 2006).

1.2 Anticuerpos y sondas.

El anticuerpo policlonal contra la forma extracelular del BUNV (anti-BUNV) y el anticuerpo monoclonal MAb742 contra la glicoproteína Gc del BUNV (anti-Gc) (Watret y cols., 1985; Lappin y cols., 1994; Weber y cols., 2001) fueron cedidos por el profesor Richard M. Elliott. Así como los anticuerpos policlonales anti-L, generados en conejo contra las regiones amino y carboxilo terminal de la proteína L (Jin y Elliott, 1992), y anti-NSm, desarrollado contra el péptido TDQKYTLDEIADVLQA equivalente a los residuos 338 al 353 del segmento M (Nakitare y Elliott, 1993).

El anticuerpo policlonal contra la proteína de la nucleocápsida (anti-NC) se obtuvo mediante inmunización en conejo con un péptido sintético de secuencia MIELEFHDVAANTSST, correspondiente con la región amino terminal de la proteína (Fontana y cols., 2008).

Para marcar específicamente el aparato de Golgi en células de mosquito se utilizaron tres anticuerpos generados en conejo: el anticuerpo contra la proteína GM130 (anti-GM130), el anticuerpo contra la proteína p115 (anti-p115), ambos cedidos por el Dr. Martin Lowe (“Faculty of Life Sciences”, Universidad de Manchester, Reino Unido), y el anticuerpo anti-AP3 contra la subunidad Δ de la proteína AP-3 que fue donado por la Dra. Margaret Robinson (“Cambridge Institute for Medical Research”, Reino Unido) (Nakamura y cols., 1995; Lowe y cols., 1998; Kondylis y cols., 2001).

El anticuerpo monoclonal DG13 que reconoce un epítipo carbohidrato de membranas del Golgi en *Drosophila* (proteína similar a la humana MG160) fue cedido por el Dr. Vivek Malhotra (Universidad de California, EEUU).

El anticuerpo contra la proteína gigantina (proteína residente del aparato de Golgi) fue cedido por el Dr. M. Renz (“Institute of Immunology and Genetics”, Karlsruhe, Alemania).

El anticuerpo monoclonal específico contra la proteína disulfuro isomerasa (anti-PDI), marcador del RER, se obtuvo de BioNova Científica SL, Madrid, España.

El anticuerpo monoclonal de ratón específico contra la proteína metalotioneína (anti-MT) se compró en Abcam plc. Cambridge, Reino Unido.

El anticuerpo monoclonal contra el epítipo V5 (anti-V5) generado en ratón se compró en AbD Serotec, Kidlington, Reino Unido.

El anticuerpo monoclonal generado en ratón contra la subunidad β de la tubulina (anti-Tb) y la sonda para núcleos diclorato de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) se obtuvieron en Sigma-Aldrich®.

Los distintos anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos Alexa Fluor® (488 nm y 594 nm) generados en cabra contra las fracciones constantes de los anticuerpos de conejo, ratón y rata; la sonda marcadora de nucleos To-Pro®, y las sondas específicas de mitocondrias MitoTracker® Green FM y de lisosomas LysoTracker® Red DND-99, así como la faloidina conjugada con Alexa Fluor® (488 nm), droga que se une específicamente a F-actina, se compraron en Molecular Probes®/Invitrogen™.

El anticuerpo secundario contra la fracción constante de los anticuerpos de conejo (anti-RB) generado en cabra, y conjugado con oro coloidal de 10 nm de diámetro es de la casa comercial British Biocell International Ltd., Cardiff, Reino Unido.

Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (anti-POD) se obtuvieron en Amersham-GE Healthcare, Friburgo, Alemania.

1.3 Enzimas y otros reactivos.

Las enzimas KpnI, SacI, SalI y DpnI (y sus correspondientes tampones de reacción), la polimerasa de alta fidelidad Phusion[®] (y su tampón de reacción), así como la ligasa T4 (y su tampón de reacción) son de New England BioLabs Inc., Ipswich, EEUU.

Los kits para la defosforilación de los extremos de vectores linearizados (“Rapid DNA Dephos & Ligation Kit”) y para la purificación de productos de PCR (“High Pure PCR Product Purification Kit”), los inhibidores de proteasas (IP) “Complete Mini Proteasa Inhibitor Cocktail tablets”, y el kit completo para los ensayos de sensibilidad a la enzima N-glicosidasa F (PNGasaF), así como la enzima endo- β -N-acetilglucosaminidasa (endoH), se obtuvieron en Roche Diagnostics, Indianápolis, EEUU.

El reactivo Lipofectamina 2000, utilizado para la formación de liposomas como vehículo de transfección, es de Gibco[®]/Invitrogen[™].

Los kits para el aislamiento de plásmidos a pequeña (“QIAprep Spin Miniprep Kit”) y gran escala (“QIAGEN Plasmid Maxi Kit”), así como el kit para la purificación de DNA mediante escisión de banda de electroforesis “Gel Extraction Kit”, se compraron en QIAGEN NV., Venlo, Países Bajos.

El medio de montaje para inmunofluorescencias (ProLong[®] Gold), la saponina utilizada como permeabilizante celular, y el Optiprep[®] para preparar gradientes de densidad se obtuvieron en Sigma-Aldrich[®].

El kit para el revelado de la reacción de POD, “Enhanced Chemiluminiscence (ECL) Plus Western Blotting Detection”, es de Amersham-GE Healthcare.

El marcador de pesos moleculares de proteínas utilizado en este trabajo fue el “Precision Plus Protein TM Dual Color Standards” de Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EEUU. El marcador de pesos moleculares para DNA, el “1 kb DNA ladder” de Promega Corp., Fitchburg, USA.

El tampón de lisis “passive lysis buffer” y el sistema de revelado de quimioluminiscencia “Dual-Luciferase[®] and Reporter Assay System” son de Promega Corp.

1.4 Soluciones de trabajo.

PBS.....NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 2mM; pH 7,4.

TEN.....Tris-HCl 0,01 M; NaCl 0,1 M y EDTA 1 mM; pH 7,4.

TAE.....Tris base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM y EDTA 2 mM.

Tampón de bloqueo para WB.....Leche en polvo al 3%; Tween-20 al 0,05 % en PBS.

TBG.....Tris-HCl 30 mM pH 8.0; NaCl 150 mM; BSA al 0.1% y gelatina al 1%

Tampón de desnaturalización de endoH.....SDS al 15% y β-mercaptoetanol al 1%

Tampón de reacción de endoH.....Citrato sódico 0,5 M pH 5 y EDTA 0,6%

Tampón citoesqueleto (CB).....Ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidrato (MES) 10 mM pH 6,1; KCl 138 mM; MgCl 3 mM y EGTA 2 mM.

2. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS.

2.1 Digestión con las enzimas endoH y PNGasaF.

Estos ensayos sirven para determinar el tipo de azúcares unidos a las glicoproteínas. La endo-β-N-acetilglucosaminidasa, o endoglicosidasa H (endoH), digiere los oligosacáridos ricos en manosa unidos a asparagina (N) pero no los oligosacáridos procesados de forma más compleja. Sin embargo, la N-glicosidasa F (PNGasaF) es una amidasa que digiere los oligosacáridos unidos a residuos N, tanto ricos en manosa, como híbridos y complejos.

Para los ensayos de digestión con endoH, las muestras de viriones (fracciones de virus purificados) se incubaron en un tampón desnaturalizante durante 5 min a 95°C, y posteriormente con la enzima durante 1,5 h a 37°C en el tampón de reacción. Esta operación se repitió 2 veces para aumentar el rendimiento de la reacción.

La reacción con PNGasaF se realizó, también en fracciones de virus purificados, con un kit comercial según las recomendaciones del fabricante.

Una vez transcurridas ambas reacciones se realizaron WB de las muestras digeridas, y de los controles sin digerir, para detectar si las glicoproteínas virales Gn y Gc fueron sensibles a la acción de estas enzimas.

2.2 Electroforesis en gel de acrilamida-poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS).

Con este ensayo se consigue la separación de las proteínas existentes en una muestra biológica según su peso molecular, ya que el dodecilsulfato sódico (SDS) que se añade a los geles de acrilamida-bisacrilamida desnaturaliza las proteínas y las confiere una carga eléctrica negativa proporcional a su masa, posibilitando su migración diferencial cuando son sometidas a un campo eléctrico.

Las electroforesis se realizaron mediante protocolos estándar. Las diferentes muestras (células, sobrenadantes con partículas virales y virus purificados) se incubaron en tampón de carga (que desnaturaliza las proteínas, da densidad y las tiñe para seguir su avance en el gel durante la electroforesis) y se realizó un choque térmico de 95°C para conseguir la total desnaturalización.

Los geles de tipo discontinuo cargados con las muestras ya procesadas, así como con el marcador de pesos moleculares fueron sometidos a un campo eléctrico de 120 mV en el sistema de electroforesis “Mini-Protean[®]” acoplado a una fuente eléctrica “Bio-Rad Power-PAC[™] 300” (Bio-Rad Laboratories Inc.).

Las bandas de proteínas resultantes se revelaron mediante tinción con azul de Coomassie, un colorante general de proteínas. Se calcularon los pesos moleculares de las proteínas separadas mediante comparación con el patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos.

Cuando se requirió realizar ensayos de inmunomarcaje sobre los perfiles electroforéticos, las proteínas de los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en lugar de ser teñidas.

2.3 Inmunotransferencia e inmunomarcaje (“Western Blot”).

Esta técnica se realiza para localizar e identificar, mediante inmunoensayo de tipo indirecto, proteínas específicas presentes en muestras biológicas previamente separadas por PAGE-SDS.

Las muestras sometidas previamente a PAGE-SDS se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa pura “Trans-Blot[®] Transfer Medium” según protocolos estándar en un sistema de transferencia de tipo semi-húmedo “Trans-Blot[®] Semi Dry Transfer Cell” (Bio-Rad Laboratories Inc.), durante 50 min a 15 V.

La membrana transferida se incubó en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C en agitación para evitar posteriores uniones inespecíficas de los anticuerpos utilizados en el inmunoensayo.

Tras el paso de bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo, durante 1 h a temperatura ambiente (RT, del inglés “Room Temperature”), y posteriormente se lavó e incubó con anti-POD durante 1 h a RT. Tras esta última incubación, la membrana se lavó de nuevo y se puso en contacto con el reactivo ECL siguiendo las indicaciones del fabricante, tras lo cual se reveló la reacción quimio-luminiscente en una película fotográfica “RP2 plus” de Agfa Healthcare NV., Mortsel, Bélgica.

3. BIOLOGÍA MOLECULAR.

3.1 Obtención de plásmidos recombinantes con proteínas de fusión del BUNV con el “tag” MT.

Los plásmidos base con todas las características necesarias que utilizamos para la generación de BUNV recombinantes mediante genética reversa son los de la serie pT7ribo, descritos en Bridgen y Elliott, (1996).

Para la inserción de una secuencia de MT en la polimerasa viral se utilizó el plásmido pT7ribo que llevaba la secuencia correspondiente al cDNA del segmento genómico L. Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del plásmido con los cebadores apropiados para insertar dianas de restricción para las enzimas SacI y KpnI en el lugar L4 (correspondiente al aminoácido 1935) y L5 (correspondiente al 2046). Para amplificar el pT7riboL desde el sitio L4 se utilizaron los oligos CCTGGTACCTCTGGATTGTAATCCTTC (para añadir el sitio de restricción de KpnI) y GACTGAGCTCGGCCCTAGGTATAACAAAATG (para añadir el sitio de restricción de SacI). Para amplificar el pT7riboL desde el sitio L5 se utilizaron los cebadores CCTGGTACCATCGCCATTACATTCTAATATTC (para añadir un sitio de restricción para la enzima KpnI) y GTACGAGCTCGAGCAAGGAGAACTAAT ATTTTC (para añadir un sitio de restricción para la enzima SacI).

Para la inserción de 2 secuencias en tándem de MT en la secuencia de la proteína NSm se utilizó el plásmido pT7riboBUNM-NSM-EGFP (Shi y cols., 2006), que lleva la secuencia de EGFP fusionada a la proteína NSm flanqueada por sitios de restricción para la enzima SacI. Antes de realizar la ligación con el inserto 2TM, se digirió el pT7riboBUNM-NSM-EGFP con SacI para escindir la secuencia de EGFP siguiendo las indicaciones del fabricante, y se purificó el vector pT7riboBUNM resultante mediante el kit “Gel Extraction Kit” (QIAGEN NV.).

Como molde para la amplificación por PCR de la secuencia de MT utilizamos el plásmido diseñado con la ayuda del Dr. Alberto Fraile-Ramos y sintetizado por GenScript Corp. (Piscataway, EEUU) que contiene 2 secuencias de MT en tándem insertadas en la secuencia de la proteína viral NSm, y que denominamos pUC57-NSm-2MT. Los cebadores para la amplificación y la inserción de sitios de corte para las enzimas SacI y KpnI fueron GATGAGCTCTGCACAACATGTACACTTG y CCTGGTACCATGGACCCAAATTGTAG respectivamente. Para la amplificación de 2MT y la introducción de sitios de corte para la enzima SacI se utilizaron los cebadores CCTGAGCTCATGGACCCCAACTGCTC y GATGAGCTCTGCACAACATGTACACTTG.

Los programas de amplificación por PCR constan de 3 etapas. Una inicial de desnaturalización, una intermedia de extensión y una final de anillamiento. Las PCR se realizaron mediante protocolos estándar utilizando la polimerasa de alta fidelidad Phusion[®], las condiciones de la reacción fueron:

Para amplificar el pT7riboBUNL4/L5	Para amplificar 1 MT y 2 MT
1X 98° C 1 min	1X 98° C 1 min
25X 98° C 10 seg	30X 98° c 10 seg
58° C 30 seg	58° C 15 seg
72° C 4 min	72° C 20 seg
1X 72° C 3 min	1X 72° C 1 min

Los productos de estas PCRs fueron comprobados por electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (BrEt) a un voltaje de 100 mV. El BrEt es un agente intercalante de ácidos nucleicos que, una vez unido a DNA, emite una fuerte señal fluorescente que se puede observar en un transiluminador de luz UV a 302 nm. Después, los productos de PCR se purificaron con un kit comercial de Roche Diagnostics según las instrucciones del fabricante.

Previamente a la reacción de ligación entre vector e inserto, se realizaron digestiones con las enzimas adecuadas para crear los extremos correctos para el clonaje (KpnI y SacI en el caso de pT7riboBUNL4/L5 y MT, y SacI en el caso de pT7riboBUNM, utilizando los tampones y condiciones indicados por el fabricante. Asimismo, también se realizaron digestiones con la enzima DpnI encargada de eliminar los restos del molde utilizado en la PCR. Estas digestiones se realizaron a 37 °C durante toda la noche (ON, del inglés “Over Night”).

Tras esto, para evitar religaciones, se digirieron los vectores con un kit de defosforilación de Roche Diagnostics durante 1 h a 37 °C.

Las reacciones de ligación entre inserto y vector se realizaron con la ligasa del bacteriofago T4 (New England BioLabs) siguiendo una relación molar de 3:1 (inserto:vector), durante 10 min a RT.

Para amplificar los plásmidos subclonados se transformaron mediante choque térmico de 30 seg (pasando de 4° C a 42° C) células *E. coli* competentes de alta eficiencia específicas para la clonación de genes tóxicos “NEB 5-alpha F'Iq competent cells” (New England BioLabs). Se sembraron en medio LB con ampicilina como antibiótico de selección y se incubaron ON a 37 °C.

Al día siguiente se realizó un cribado de las colonias transformantes mediante PCR (“PCR screening”). Esta técnica permite realizar un cribado amplio de las colonias transformantes en muy poco tiempo. Una parte de las células de las colonias crecidas en el medio de selección se incubaron con los cebadores utilizados para la amplificación de los insertos de MT. Estas PCRs se realizaron con las mismas condiciones descritas anteriormente para la amplificación de las secuencias de MT y 2 MT, pero con un mayor tiempo de desnaturalización para asegurar la completa lisis de las bacterias.

Posteriormente se realizaron electroforesis en geles de agarosa de los productos de esas PCRs, comprobándose la existencia o no de bandas de DNA de tamaño similar al inserto. Las colonias positivas se crecieron en medio LB líquido con ampicilina ON a 37 °C en agitación, y se realizaron comparaciones de los patrones de restricción resultantes de la digestión con la enzima PstI de los presuntos plásmidos pT7riboBUNL4-MT/L5-MT y con SalI del presunto pT7riboBUNM-NSm-2MT. Ese patrón de restricción era diferente dependiendo de si el vector llevaba o no un inserto de la longitud esperada.

Se amplificó el DNA plasmídico de aquellas colonias positivas mediante minipreps con kit QIAprep, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, y se secuenció en el servicio de secuenciación de la Universidad de Dundee (Reino Unido) para confirmar la correcta inserción de la secuencia de la MT.

Una vez confirmada la secuencia de las construcciones, se amplificó el DNA mediante maxiprep con kit QIAGEN siguiendo las recomendaciones del fabricante.

En las figuras 15 y 16 se puede ver un esquema resumido de los pasos seguidos en este apartado.

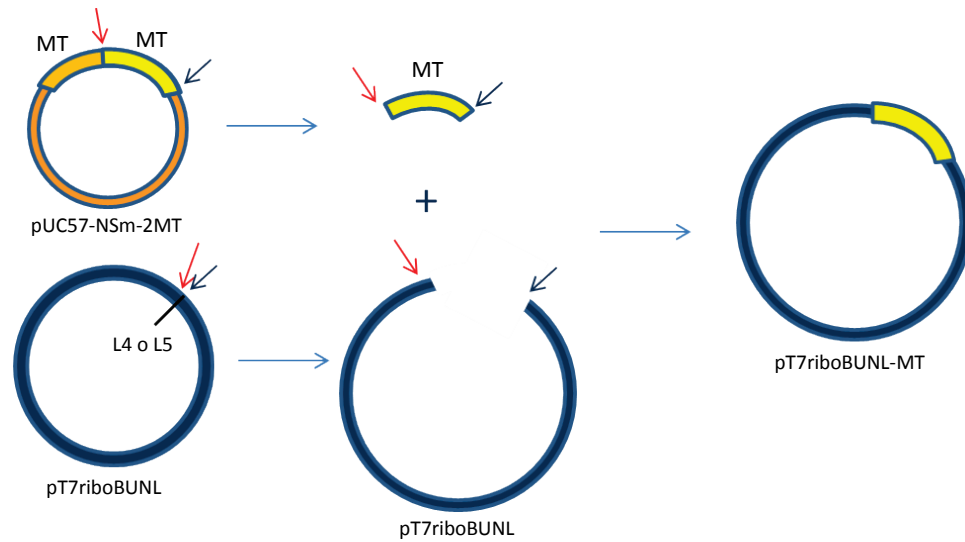


Figura 15. Esquema de la estrategia utilizada para obtención de proteínas de fusión L-MT.

Las flechas roja y azul representan los sitios de unión de los cebadores para la amplificación por PCR de los segmentos flanqueados por dichas flechas. Estos cebadores introducen dianas de restricción para las enzimas SacI y KpnI respectivamente.

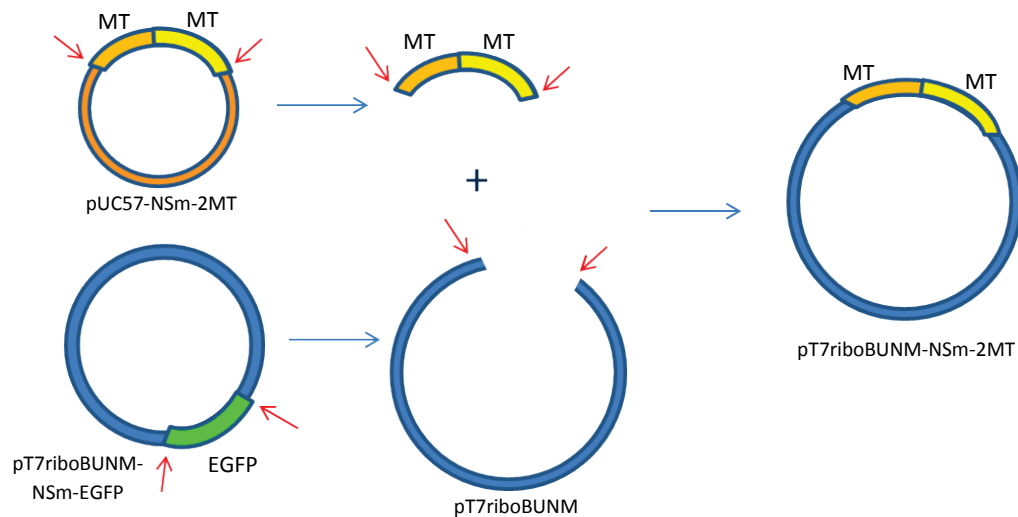


Figura 16. Esquema de la estrategia utilizada para obtención de proteínas de fusión NSm-2MT.

Las flechas rojas en el pUC57-NSm-2MT representan los sitios de unión de los cebadores para la amplificación por PCR del segmento flanqueado por ellas. Estos cebadores introducen dianas de restricción para las enzimas SacI. Las flechas en el pT7riboBUNM-NSm-EGFP indican los sitios de restricción de la enzima SacI. Previo a la ligación con 2MT se digirió este plásmido con SacI para escindir la secuencia de EGFP y se purificó por escisión de banda en electroforesis.

3.2 Ensayo de funcionalidad de la polimerasa recombinante.

La actividad de la proteína polimerasa se puede cuantificar mediante ensayos de mini-replicón (Kohl y cols., 2004), de forma que es posible analizar la actividad de las polimerasas virales quiméricas fusionadas a MT.

Para ello, se transfectaron con lipofectamina células BSR-T7/5 con pT7riboBUNL4-MT (o pT7riboBUNL, como control positivo), pT7riboBUNS y pT7riboBUNM-RLuc (con la secuencia de la luciferasa de *Renilla reniformis* insertada en el segmento M) según el protocolo descrito previamente por Shi y Elliott, (2009). Si la polimerasa viral recombinante L4-MT fuese funcional sería capaz de replicar el segmento M co-transfectado y se expresaría también la luciferasa Renilla, capaz de provocar una reacción lumínica. Como control interno de transfección, se utilizó un plásmido de expresión de la luciferasa de luciérnaga (*Lampyrus noctiluca*).

Para evaluar la expresión de ambas luciferasas se lisaron las células con tampón de lisis, durante 20 min a RT en agitación y se utilizó el sistema de revelado de quimioluminiscencia (ambos de Promega Corp.), según los protocolos recomendados por el fabricante.

3.3 Generación de virus recombinantes con “tag” MT.

La generación de virus recombinantes mediante genética reversa se realizó según el protocolo descrito previamente por el Prof. Richard M. Elliott (Shi y cols., 2006). Brevemente, se realizaron co-transfecciones con lipofectamina de células BSR-T7/5 con los diferentes plásmidos correspondientes a los cDNA de los distintos segmentos genómicos, siendo el del segmento L el plásmido recombinante pT7riboBUNL4-MT o pT7riboBUNL5-MT (en el caso de virus con “tag” de MT en la polimerasa viral), o el del segmento M el plásmido recombinante pT7riboBUNM-NSM-2MT (en caso de virus con “tag” de 2MT en tándem en la proteína NSm).

El control negativo carecía de uno de los plásmidos y el control positivo tenía los plásmidos de genotipo original de BUNV.

Una vez transfectadas las células, se incubaron a 37°C y se recolectaron los sobrenadantes tras 4 días y 9 días. Se almacenaron a -80°C y se titularon para evaluar la existencia de virus infectivos. En la figura 17 se muestra un esquema de esta técnica.

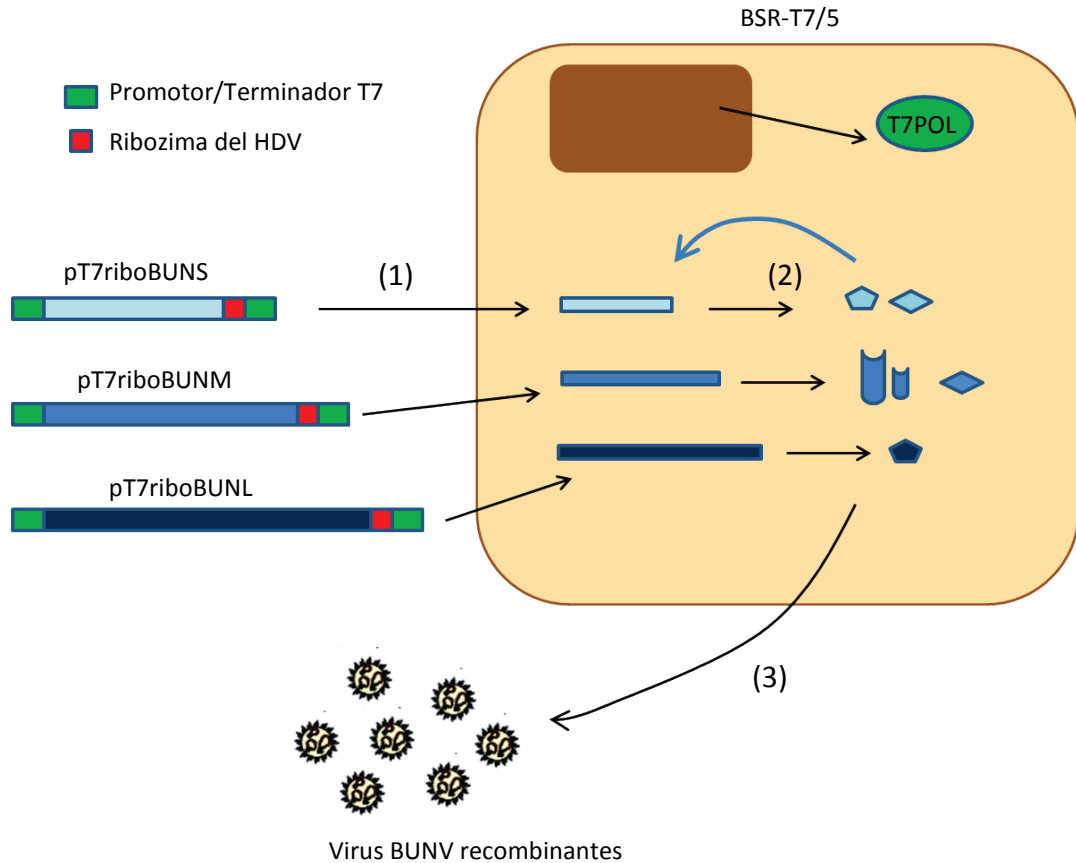


Figura 17. Esquema del protocolo de obtención de virus recombinantes mediante genética inversa.

(1) Células que expresan la polimerasa del fago T7 son co-transfectadas con cDNA correspondiente a los segmentos genómicos bajo control del promotor del fago T7 y con la ribozima del virus de la hepatitis Delta. (2) En las células transfectadas estos segmentos traducirán las proteínas virales que a su vez replicarán y encapsidarán los segmentos genómicos generando virus recombinantes. (3) Las células transfectadas liberarán los virus recombinantes por los mecanismos normales de salida del virus descritos en la introducción.

4. BIOLOGÍA CELULAR.

4.1 Mantenimiento de líneas celulares.

Las líneas celulares de mamífero fueron cultivadas a 37 °C bajo una atmósfera de CO₂ del 5%. Las células de insecto a una temperatura de 28 °C.

Se realizaron subcultivos periódicos del 10% de las células en medio de cultivo fresco cada 2-3 días según el estado de confluencia. Para realizar estos pases, las células de mamífero fueron tratadas con una solución de tripsina y ácido

etilendiaminotetraacético (EDTA) para despegar y separar las células. En el caso de las células de insecto, se separaron del soporte mediante rascado y se homogeneizaron por agitación manual.

Para el almacenamiento de las distintas líneas celulares utilizadas durante este estudio, se congelaron alícuotas en nitrógeno líquido que, previamente, se habían criopreservado en medio de cultivo con 10% de dimetil sulfóxido (DMSO). El proceso de congelación se realizó en un tanque con alcohol isoamílico para conseguir una congelación gradual y, por tanto, una mayor supervivencia de las células tras el proceso de congelación-descongelación.

4.2 Tratamiento con sales de oro.

Se crecieron células BHK-21 en Thermanox[®] (NUNC[™], Nalge Nunc Int., Rochester, EEUU) y se incubaron con las distintas sales de oro.

Las diferentes sales de oro y condiciones fueron:

- Cloruro auroso (AuCl): 100 μ M y 1 mM en DMEM completo sin FBS y 100 μ M en DMEM con 2 % FBS, durante 3 h.
- Aurotiomalato (AuT): 1 mM y 10 mM en DMEM completo sin FBS y 1 mM en DMEM con 2 % FBS, durante 8 h.

Tras ello, las muestras fueron fijadas, vitrificadas y criosustituidas para su análisis mediante TEM según los protocolos indicados en el apartado 6.2.

4.3 Infecciones con BUNV.

4.3.1 Infección convencional.

Las células en cultivo, crecidas en placas o cubreobjetos, se pusieron en contacto con el inóculo viral normalmente a una multiplicidad de infección (MOI) de 1 PFU/cel. Tras 1 h de adsorción con agitación cada 15 min, tiempo suficiente para que los virus en suspensión se anclen a los receptores de la superficie celular, se retiró el inóculo, se lavaron las células y se añadió medio de cultivo fresco con un porcentaje del 2% de FBS, para ralentizar la división de las células.

4.3.2 Infección mediante centrifugación.

Es una modificación que se utilizó para aumentar la eficacia de la infección.

En esta variante la hora de adsorción se realizó centrifugando a 4 °C y una velocidad de 4000 g en centrifuga Megafuge 1.0 R (Heraeus GmbH, Hanau, Alemania) con rotores Sorvall® (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EEUU) con adaptadores para placas de cultivo. De esta forma, se consigue que un mayor número de virus en suspensión se adhieran a las membranas plasmáticas, aumentando así el porcentaje de infección. También se impide la entrada masiva de los virus durante la adsorción, ya que a una temperatura de 4°C el metabolismo está ralentizado y la internalización de receptores puede considerarse detenida. De esta forma, cuando se pasan los cultivos a una temperatura óptima de incubación, se provoca la entrada masiva y sincrónica de los virus previamente adsorbidos.

4.4 Producción de partículas virales (“stocks” virales).

4.4.1 “Stocks” de trabajo.

Este protocolo se utilizó para obtener sobrenadantes con partículas virales en suspensión con las que realizar las infecciones.

En el caso de producción de viriones en células BHK-21 o Vero, se infectaron células confluentes crecidas en forma de monocapa a baja multiplicidad (0,001 PFU/cel) para conseguir una infección gradual de las células y evitar así una lisis rápida del cultivo. Asimismo, las células se mantuvieron a 32°C, temperatura menor que la óptima de crecimiento, para ralentizar así el metabolismo celular y por tanto la dinámica de la infección; esto retrasa la lisis final de las células infectadas, aumentando así el rendimiento de la producción de partículas virales. Tras 3 días post-infección (dpi) se recolectó el sobrenadante, se congeló a -80°C y se almacenó.

En el caso de las células C6/36, se infectaron a una multiplicidad de 0,5 FFU/cel y se incubaron a la temperatura óptima de crecimiento de 28°C. Ya que el BUNV no produce lisis celular, no fue necesario modificar el protocolo de infección, como en el caso de células de mamífero, para mejorar el rendimiento.

4.4.2 “Stocks” élite.

Este protocolo se utilizó para la producción de sobrenadantes con partículas virales de rBUNM-NSm-EGFP. Se ha visto que en estos virus recombinantes se produce un cambio en su integridad genómica si se realizan varios pases de amplificación en células. Los virus, mediante un mecanismo desconocido hasta ahora, mutan a su composición genómica original, escindiendo la secuencia correspondiente a la EGFP y perdiendo su utilidad como virus fluorescente.

Para evitar esto se seleccionaron sólo aquellos focos de infección que mantenían intacta la capacidad de expresar EGFP. Para ello se infectaron células C6/36 con rBUNM-NSm-EGFP y se cultivaron en medio de cultivo solidificado con metilcelulosa al 1 % y se incubaron a 28°C.

Tras 2 dpi se identificaron bajo el microscopio los focos positivos en fluorescencia, se recogieron a través de una pipeta estéril y disolvieron en PBS (del inglés, “Phosphate Buffered Saline”). Estas alícuotas “élite”, se titularon y almacenaron.

4.5 Titulación.

Para realizar infecciones virales es necesario conocer la concentración de virus infectivos existentes en los inóculos. También es un ensayo necesario para contabilizar la cantidad de partículas virales infectivas liberadas por células infectadas en distintos tiempos o condiciones.

Para ello, se infectaron células confluentes cultivadas en placas multipocillo con diluciones decimales seriadas de las muestras a titular y se incubaron con un medio de cultivo semi-sólido para favorecer la formación localizada de los focos de infección. Este medio se suplementó con FBS al 2% para evitar la división activa de las células.

Tras 4 dpi, las células se fijaron con formaldehído (FA) al 10% en PBS durante 1 h y se procedió al recuento de los focos de infección, obteniéndose así el número de virus infectivos por unidad de volumen.

Dependiendo si la titulación se realizó sobre células de mamífero o de insecto utilizamos dos variantes.

4.5.1 En células de mamífero (Vero y BHK-21).

El medio semi-sólido empleado fue el medio de cultivo DMEM completo solidificado con agar al 0,6 %. Tras la fijación, se tiñeron las células con cristal violeta al 0,1% en metanol-agua (20:80) y se contaron las placas de lisis formadas en la placa de cultivo. El resultado se expresa en PFU/ml (unidades formadoras de placas de lisis por ml).

4.5.2 En células de mosquito (C6/36).

En este caso el agente solidificante del medio de cultivo fue metilcelulosa al 1%. Ya que en este tipo celular los virus no producen la muerte de las células infectadas, para poner de manifiesto los focos de infección se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta sobre las células fijadas (Adaptado de Payne y cols., 2006). En primer lugar se realizó un bloqueo con FBS al 2% en PBS, se incubó con el

anticuerpo primario anti-BUNV y, tras varios lavados, con anti-RB Alexa[®] 488 nm. Las unidades formadoras de focos de infección se contaron en un microscopio invertido de fluorescencia Zeiss Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss Int.) El resultado se expresa en FFU/ml (unidades formadoras de focos fluorescentes).

4.6 Purificación de partículas virales.

La obtención de fracciones ricas en partículas virales extracelulares se realizó mediante separación por centrifugaciones en gradiente de densidad.

Las infecciones se realizaron de igual forma que para la preparación de stocks de trabajo.

Se incubaron las células infectadas durante 50-60 h. Pasado este tiempo se retiró el sobrenadante que contenía los virus extracelulares y se clarificó, para eliminar restos celulares, mediante centrifugación a 3700 g durante 20 min a 4°C en centrífuga Sorvall y rotor GSA. Posteriormente, se pasó el sobrenadante con los virus a través de un colchón de sacarosa al 30% (peso/volumen) en TEN con inhibidores de proteasas (IP), que se centrifugó a 67.000 g durante 2,5 h a 4°C en una centrífuga Beckman con rotor de tipo SW28. El sedimento obtenido en este paso se centrifugó en un gradiente de densidad continuo de Optiprep[®] de 13 al 22% (volumen/volumen) en TEN con IP a 250.000 g durante 1,5 h a 4°C en una centrífuga Beckman con rotor SW41ti. Tras esta última centrifugación, las distintas fracciones del gradiente se recolectaron en pequeñas alícuotas desde la menos densa (parte superior del gradiente) hasta la más densa (parte inferior del gradiente).

Las alícuotas obtenidas se analizaron mediante TEM tras realizar tinciones negativas (TN), y mediante PAGE-SDS. Se almacenaron aquellas fracciones ricas en partículas virales.

El gradiente de densidad se preparó añadiendo una a una las capas de Optiprep[®], cada una un 1% más concentrada que la anterior, empezando por la de concentración más alta. Antes de añadir la capa siguiente, se congeló la anterior manteniendo el tubo en hielo seco. De esta forma, durante la descongelación del tubo se produjo la formación de un gradiente continuo.

5. MICROSCOPIA ÓPTICA.

5.1 Visualización de células en cultivo.

La visualización de células en cultivo es muy útil para muchos estudios, como para el recuento del número de células o contactos entre ellas, visualización de morfología celular, identificación de células fluorescentes, etc.

Para experimentos en donde fue necesaria la localización concreta de las células para evaluar su movimiento con el tiempo o para realizar microscopía correlativa se utilizaron placas con fondo graduado P35G-2-14-CGRD de MatTek Corp. (Ashland, EEUU). Para el resto, las placas o botellas de cultivo convencionales.

Se utilizaron microscopios invertidos Zeiss Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss Int., Jena, Alemania) con un set de filtros para obtener imágenes de contraste fases y de fluorescencia. Las distintas imágenes se recogieron con una cámara digital CCD (del inglés, “Charge Coupled Device”) Leica DFC 300 FX (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania).

5.2 Localización de proteínas virales y celulares mediante inmunofluorescencia indirecta (IFA).

Las células fueron crecidas en cubreobjetos estériles de vidrio, y en las condiciones y tiempo adecuados, se fijaron.

La fijación convencional se realizó con paraformaldehído (PFA) al 4 % en PBS durante 30 min a 4° C. Una variación que se usó para visualización de componentes del citoesqueleto es la utilización PFA al 3,8 % con glutaraldehído (GA) 0,2 % y Triton X-100 al 0,05 % en tampón citoesqueleto (CB).

Otra alternativa que se utilizó para la localización de ciertos antígenos fue la fijación por deshidratación en metanol a -20° C durante 5 min.

Una vez fijadas, las células se permeabilizaron con saponina al 0,25 % en PBS o CB (para IFA de componentes del citoesqueleto) durante 10 min a RT, en el caso de localización de antígenos en el interior celular. Cuando se realizaron las IFA para localizar proteínas de la cara externa de la membrana plasmática no se utilizó permeabilizante. En el caso de fijación con metanol no fue necesaria la permeabilización ya que el metanol es también agente permeabilizante.

Tras ello, se realizó un paso de bloqueo para eliminar ruido inespecífico de fondo. Se utilizó suero de cabra al 20 % en PBS o CB con 0,25 % de saponina (sin saponina en

el caso de células fijadas con metanol o en el caso de localización de componentes de la superficie celular) durante 40 min.

El anticuerpo primario específico contra el componente a localizar se diluyó a la concentración de trabajo en PBS o CB con el 2 % de suero de cabra y 0,25 % de saponina (cuando fue necesario) y se incubó durante 1 h a RT. Tras ello se lavó con PBS o CB para eliminar el exceso de anticuerpo no unido.

Se incubó con el anticuerpo secundario fluorescente 1 h a RT en PBS o CBS con el 2 % de suero de cabra y 0,25 % de saponina (si fue necesario) y, posteriormente, con las sondas, cuando se utilizaron, para marcar el núcleo (DAPI o ToPro3) o F-actina (faloidina conjugada). Las incubaciones con las sondas fueron de 20 min. Tras otros tres lavados se montó la preparación con ProLong® en un porta-muestras.

En el caso de visualización por microscopía de epifluorescencia se utilizaron microscopios, Zeiss Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss Int.) y Leica DM RXA (Leica Microsystems GmbH), ambos con cámara digital CCD Leica DFC300 FX acoplada.

Cuando se requirieron estudios de co-localización de dos o más antígenos se utilizó un microscopio Zeiss Axiovert 200 (Carl Zeiss Int.) con un sistema de escaneado laser Bio-Rad Radiance 2100 (Bio-Rad Laboratories Inc.) o un microscopio confocal espectral Leica TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH). Estos sistemas son capaces de analizar las imágenes de fluorescencia en diferentes planos del eje Z.

5.3 Video-microscopía.

Estos experimentos se realizaron para analizar la dinámica de la proteína NSm en células C6/36 infectadas con rBUNV-NSm-EGFP. Estas células se crecieron en placas de cultivo con fondo de vidrio P35G-1,5-14-C de MatTek Corp.

Las células se mantuvieron con las condiciones adecuadas de cultivo gracias a la cámara de incubación montada sobre un microscopio confocal espectral Leica TCS SP5, en donde se recogieron imágenes DIC y de fluorescencia cada 5 minutos en las posiciones previamente seleccionadas.

Los videos se realizaron combinando las distintas imágenes secuenciales obtenidas con el software LAS AF (Leica Microsystems GmbH).

6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

6.1 Réplicas metálicas de partículas virales.

Se realizaron para el estudio estructural de la superficie de partículas virales según el protocolo descrito previamente por Cabezas y Risco (2006).

Las muestras con partículas virales se adsorbieron en láminas de mica y se vitrificaron a alta velocidad en etano líquido en una unidad de vitrificación Leica EM CPC (Leica Microsystems GmbH). Las muestras vitrificadas se transfirieron a una unidad de crio-fractura BAF 060 (BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein) en la que la muestra fue sublimada a una temperatura de -80°C y durante 2 h, antes de recubrirla con una réplica de 2 nm de Tántalo (en un ángulo de 45°) y 20 nm de carbón (a 90°).

Las réplicas metálicas así generadas se separaron de los soportes mediante flotación en lejía, se lavaron en agua MQ y se recogieron en rejillas cubiertas con Formvar® (TAAB Laboratories Equipment Ltd., Bercks, Reino Unido).

6.2 Inclusión de muestras para estudios ultraestructurales.

Siguiendo el protocolo convencional, las células se fijaron químicamente con GA al 1% y ácido tánico al 0,5% en HEPES durante 1 h a RT. Posteriormente, se recogió un sedimento de células fijadas mediante rascado de la placa de cultivo y centrifugación.

Estas células se incubaron con tetróxido de ósmio (OsO₄) al 1% y ferricianuro potásico (K₃Fe(CN)₆) al 0,8% (que aportan contraste y estabilidad a las muestras) durante 1 h a 4°C y después con acetato de uranilo (AcUr) al 2% durante 40 min a 4°C.

Las muestras, una vez así tratadas, fueron deshidratadas para sustituir el agua de las células por moléculas de solvente miscible con los componentes de la resina de infiltración. En este caso se realizó en cantidades crecientes de acetona (50, 70, 90 y 100%) durante 10 min cada incubación a 4°C. Finalmente, se dejó infiltrando la muestra en resina EML-812 (TAAB Laboratories Equipment Ltd.) diluida con acetona 1:1 (peso:volumen), durante toda la noche en agitación. Durante los siguientes dos días se hicieron dos cambios de resina pura cada 12 h y después se polimerizó en cápsulas BEEM® (Ted Pella Inc., Redding, EEUU) en un incubador a 60°C durante dos días.

En ocasiones, el estudio de sedimentos celulares en donde la orientación de las células en los cortes se produce al azar, es poco útil para la visualización de estructuras intracelulares que se encuentran en un número muy bajo o en localizaciones muy concretas. En estos casos, habrían de analizarse multitud de células para encontrar estos eventos singulares. Sin embargo, al estudiar células procesadas en forma de monocapa

orientada podemos analizar el volumen completo de la célula en el eje Z. Para ello, se obtienen las secciones ultra-finas de forma orientada, procesando toda la monocapa celular desde la zona basal a la apical.

La inclusión para realizar el protocolo fue similar al anterior, las únicas modificaciones residieron en que las células no fueron procesadas en forma de sedimentos de centrifugación sino en forma de monocapa. Para ello se utilizaron soportes plásticos, Thermanox[®] (NuncTM), o cubre-objetos de vidrio con rejilla grabada en el de caso querer localizar espacialmente regiones específicas en el cultivo. En el caso de células en Thermanox[®], La polimerización de la resina se realizó en estuches BEEM[®] (Ted Pella Inc.) en lugar de en cápsulas, o bien en placas de material plástico resistente a la acetona (en el caso de cubre-objetos).

Una variación de este protocolo incluye la sustitución de moléculas de agua por solvente a muy baja temperatura, lo que se conoce como criosustitución. A la temperatura más baja posible a la que el disolvente se mantiene líquido, la sustitución de moléculas de agua por disolvente se produciría teóricamente una a una. De esta forma, se minimizan artefactos como la extracción de componentes de la célula y se procura una mejor preservación de la ultraestructura.

Para realizar la criosustitución, la fijación se hizo como en la inclusión convencional, después se crioprotegió con glicerol al 30% y se congeló a alta velocidad en etano líquido en una unidad de vitrificación Leica EM CPC (Leica Microsystems GmbH). La vitrificación a alta velocidad hace que el agua de las células se congele adquiriendo un estado amorfo, impidiendo así la formación de cristales que afectarían la integridad ultraestructural. Las células vitrificadas se criosustituyeron en acetona con OsO₄ al 1% a – 90°C durante 48 h en una unidad de criosustitución automática Leica EM AFS2 (Leica Microsystems GmbH). Posteriormente, se pasaron de forma gradual a RT y se infiltraron en resina como en el protocolo anterior.

6.3 Inclusión de muestras para inmunocitoquímica.

En estos ensayos la fijación debe ser más suave para preservar la estructura de los epítomos de las proteínas y se realizó con PFA al 4% y GA al 0,1% en PBS durante 30 min a 4°C. Después, las células se recolectaron mediante raspado y centrifugación, se crioprotegieron y vitrificaron a alta velocidad en etano líquido, y se criosustituyeron en metanol con AcUr al 0,5% durante 48 h a – 90°C.

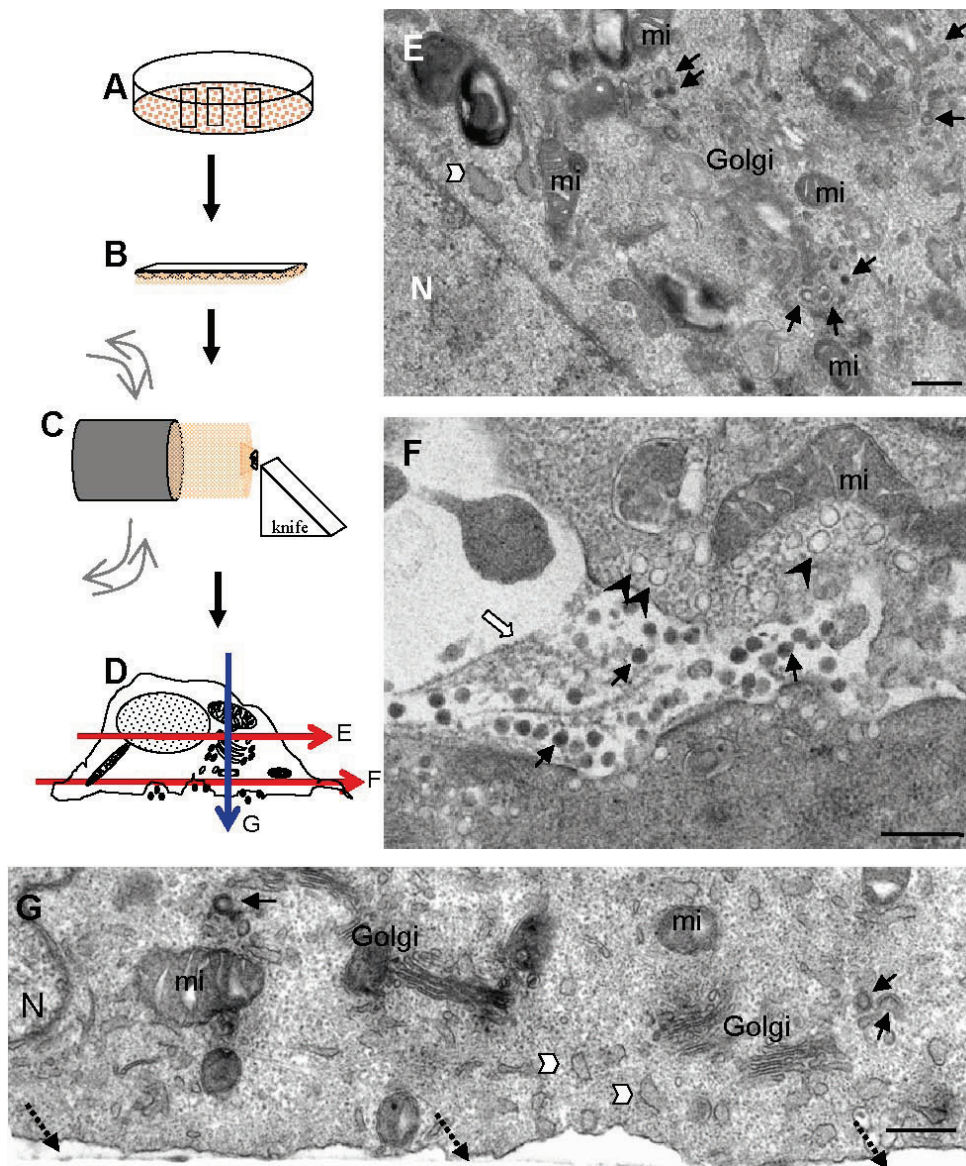


Figura 18. Obtención de sección orientadas de monocapas celulares.

(A) Células crecidas en Thermanox®. (B) Células tras haber sido incluidas en resina epoxi. (C) La monocapa se pega en cápsulas de resina y se procesa en el micrótopo para tallar un frente adecuado para el posterior corte con cuchilla de diamante. (D) La monocapa celular se secciona desde la base hasta la zona más apical. (E) Micrografía de un área de una sección orientada correspondiente a una zona media de la célula, se puede ver una factoría viral del BUNV. Las flechas negras indican ensamblados virales, las blancas el RER, N: Núcleo, mi: mitocondrias. (F) Micrografía de una sección muy cercana a la base de la célula, se pueden ver virus liberados (flechas negras), caveolas (puntas de flecha) y elementos del citoesqueleto cortical (flechas blancas). (G) Elementos de la factoría vistos en sección perpendicular a la base de la célula, las flechas discontinuas indican el soporte plástico. Barras: 300 nm.

La infiltración se realizó en resina acrílica Lowicryl® K4M (Polysciences Inc., Warrington, EEUU) durante 48 h a -20°C . Esta resina es útil para realizar ensayos de inmunomarcaje, ya que tiene la superficie rugosa lo que posibilita la exposición de

epítomos al exterior. Se realizó la polimerización de la resina con luz UV durante 48 h a -20°C y se dejó madurar durante otras 48 h a 22°C.

En el caso de estudios mediante METTEM (Risco y cols., 2012), el procedimiento seguido fue similar aunque las muestras se procesaron en forma de monocapa y el medio de criosustitución fue metanol o metanol con AcUr al 0,25 %. La inclusión se realizó en Lowicryl® HM23 (TAAB Laboratories Equipment Ltd.).

6.4 Cortes de secciones ultra-finas.

Los sedimentos de células incluidos en capsulas de resina se tallaron y se pulieron con cuchillas de vidrio fabricadas en Reichert Knifemaker (Leica Microsystems GmbH). Se cortaron secciones ultra-finas (50-70 nm) con cuchilla de filo de diamante con 45° de inclinación (Diatome Ltd., Beil, Suiza) en un ultramicrotomo Leica EM UC6 (Leica Microsystems GmbH).

En el caso de células infiltradas en forma de monocapa, las láminas de resina se pegaron sobre cápsulas para facilitar su procesamiento y corte en el ultramicrotomo. Los cortes se realizaron de forma orientada paralelos a la base, sin tallado o pulido previo (Fontana y cols., 2007 y 2008).

Las secciones ultra-finas se recogieron con un asa de hilo fino Perfect Loop (Diatome Ltd.) y se depositaron en rejillas de cobre desnudas (Gilder Grids, Lincolnshire, Reino Unido) en el caso de secciones EML-812, de oro (Gilder Grids), para el caso de los estudios de inmunomarcaje con oro coloidal, o Quantifoil/carbón “R3.5/1 Cu/Rh” (Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, Alemania) en el caso células incubadas con sales de oro.

6.5 Inmumomarcajes con conjugados de oro coloidal.

Las rejillas con las secciones de Lowicryl® K4M, se incubaron en primer lugar durante 10 min con cloruro amónico (NH₄Cl) 0,2 M para bloquear los grupos aldehído libres, tras lo que se lavaron con 3 gotas de PBS. Después con la solución de bloqueo TBG (del inglés, “Tris Buffered Gelatin”) para bloquear los sitios de uniones inespecíficas, durante 15 min. Luego se incubaron con el anticuerpo primario diluido en TBG durante 1 h. Tras 2 lavados con PBS, poniendo gotas de TBG de forma intercalada, se añadió el anticuerpo secundario conjugado con partículas de oro coloidal diluido también en TBG durante 1 h y se realizó un lavado igual que el anterior. Al final, las rejillas se pasaron por 10 gotas de agua MQ y se dejaron secar completamente.

Para realizar inmunomarcaje de partículas virales con anticuerpos específicos y conjugados de oro coloidal se procedió como sigue. Los virus en suspensión fueron sometidos a diez ciclos de congelación-descongelación para abrir las partículas y facilitar la accesibilidad de los epítomos internos a los anticuerpos. Las suspensiones fueron entonces adsorbidas a rejillas de microscopía electrónica cubiertas de una capa de plástico (Formvar®) y carbón. Estos fueron tratados 5 min con el tampón TBG para saturar la superficie de la muestra y evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. Seguidamente las muestras se incubaron 10 min con los anticuerpos primarios diluïdos en TBG y tras varios lavados en gotas de TBG las muestras fueron incubadas 10 min con los anticuerpos secundarios conjugados con oro coloidal de 10 nm. Finalmente las muestras fueron lavadas en gotas de PBS y agua MQ y se dejaron secar completamente.

6.6 Tinción de muestras.

6.6.1 Tinción negativa de virus.

Rejillas cubiertas con Formvar® al 0,75% y carbón fueron ionizadas en la unidad de descarga iónica y sombreado Leica EM MED 020 (Leica Microsystems GmbH). Esto favorece la hidrofiliidad y homogeneidad del soporte, mejorando así la adhesión de los virus a la superficie del carbón. Las suspensiones de virus se adsorbieron durante 2 min sobre las rejillas ionizadas.

Las rejillas se tiñeron con AcUr 2% durante 30 seg, se secó el exceso de líquido con papel de filtro y se dejó secar la muestra a RT, durante al menos 30 min, antes de visualizar en el microscopio electrónico de transmisión.

Alternativamente, otras muestras se tiñeron con ácido fosfotungstico (PTA) al 2% durante 40 seg. En este caso se realizó fijación previa con GA al 0,1% durante 1 min.

6.6.2 Tinción de cortes.

Las rejillas con las secciones depositadas se dejaron secar antes de teñir.

Las rejillas para estudios de ultraestructura se tiñeron en gotas de AcUr saturado durante 25-30 min y posteriormente se lavaron con 5 gotas de agua MQ. A continuación, se tiñeron con citrato de plomo (CitPb) durante 2-3 min y se lavaron con 5 gotas de agua MQ. Entre los distintos pasos, se secó el exceso de líquido de las rejillas con papel de filtro fino.

Las rejillas que se sometieron a inmunomarcaje con oro coloidal se tiñeron con AcUr 25-30 min y se lavaron después en 4 gotas de agua MQ.

Las rejillas con células sometidas a tratamiento con sales de oro no se tiñeron.

Finalmente, las rejillas fueron visualizadas mediante TEM en los microscopios Jeol JEM 1011 y JEOL 1200-EX II a un voltaje de 100 kv. Las diferentes imágenes se obtuvieron bien por impresión de negativos Kodak Electron S0-163 (Eastman Kodak Company, Rochester, EEUU) o mediante una cámara digital CCD “785-ES 1000W Erlangshen” (Gatan Inc., Pleasanton, EEUU).

7. PROCESAMIENTO DE IMÁGENES.

La edición fotográfica digital se realizó empleando los siguientes paquetes informáticos: Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Inc., San Jose, EEUU), Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), Laser Sharp 200 (Bio-Rad Laboratories Inc.), LAS AF y CW4000 FISH (Leica Microsystems GmbH), y Digital Micrograph (Gatan Inc.).

RESULTADOS

1. **El ciclo vital del BUNV en células C6/36 presenta tres fases diferenciadas.**

Como se detalla en el apartado de introducción, el establecimiento de infecciones persistentes del BUNV en células de mosquito, en contraposición a la infección citolítica en células de mamífero, ha sido descrito previamente (Newton y cols., 1981). Sin embargo, hasta el momento no existían estudios detallados del ciclo vital y la dinámica de infección en células de mosquito.

Para llevar a cabo el estudio de las primeras fases de la infección, realizamos un diseño experimental que cubría un rango amplio y detallado de puntos muestrales. Los diferentes tiempos de post-infección analizados en células C6/36 infectadas con BUNV fueron 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 25, 31, 36, 49, 57, 73, 82, 97 y 155 hpi, así como células no infectadas (células control). En cada una de estas condiciones se realizaron IFA para localizar las proteínas virales Gc y NC, y titulaciones de virus infectivos liberados al sobrenadante (figura 19 y figura 20).

A partir de las 10 hpi se detectó un aumento exponencial de la cantidad de virus infectivos en los sobrenadantes, hasta alcanzar un pico máximo a las 36-49 hpi. Tras esto, el título viral se mantuvo estacionario hasta el final del experimento, e incluso se observó un ligero decaimiento. Los niveles máximos de viriones infectivos liberados por células C6/36 (del orden de 10^7 FFU/ml) son comparables a los niveles alcanzados en células BHK-21 en experimentos realizados en condiciones similares. Sin embargo, con células Vero se alcanzaron dos órdenes de magnitud menor.

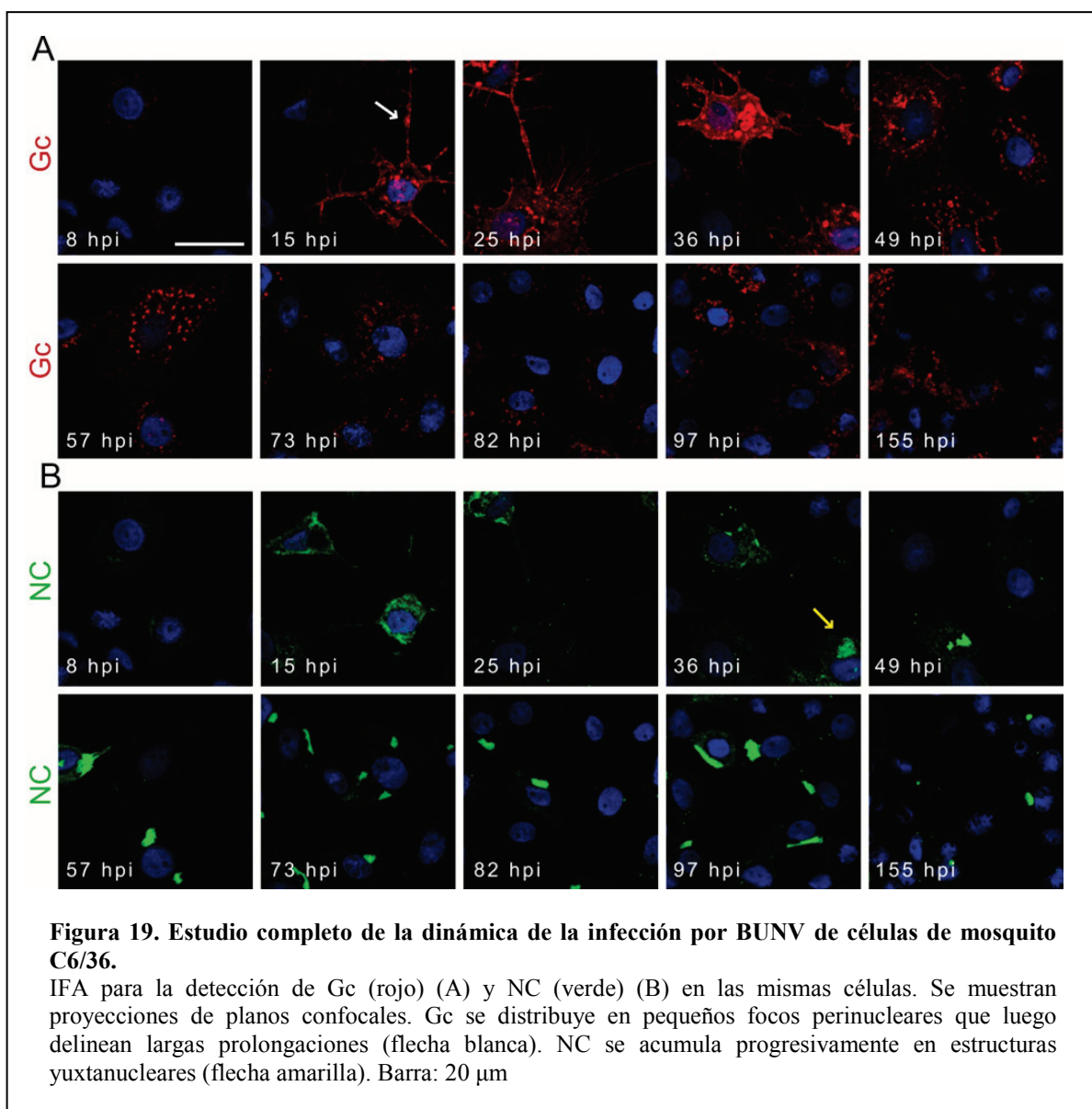
Las proteínas virales, Gc y NC, no fueron detectadas hasta las 8 hpi. En ese momento, NC se distribuía de forma difusa por todo el citoplasma. Por otro lado, la glicoproteína Gc exhibía una distribución punteada con focos de pequeño tamaño. La forma de las células era redondeada, al igual que las células no infectadas.

A las 10 hpi la situación era bastante similar, aunque la intensidad de la marca de ambas proteínas era mayor y las células empezaron a mostrar un contorno ligeramente más anguloso que las células control.

Es a las 15 hpi cuando se observó un cambio muy significativo. Entonces Gc no solo se localizó en focos discretos sino que también perfilaba el contorno de la membrana plasmática. A la vez, las células adquirieron una morfología ramificada de tipo neuronal. La proteína NC mantenía su patrón de distribución pero con una señal más intensa.

A las 36 hpi se produjo un cambio en la localización de la proteína NC, que progresivamente dejó de localizarse de forma difusa por el citoplasma, para redistribuirse hacia ciertas áreas perinucleares, en donde se acumulaba y concentraba. A estas zonas de acumulación de NC las denominamos “N-bodies”. A las 57 hpi se

observó, a nivel celular y de forma masiva en el cultivo, la coalescencia de los diferentes “N-bodies” en una única estructura que iba disminuyendo de tamaño paulatinamente.



También a partir de 36 hpi (siendo claramente patente a partir de 57 hpi), la expresión de Gc sufrió una modificación, desapareciendo de la membrana plasmática y adquiriendo de nuevo el mismo patrón punteado citoplasmático que se veía a 8-10 hpi. En estos mismos tiempos disminuyó del número de proyecciones citoplasmáticas y, a partir de las 82 hpi, las células retornaron a su característica forma redondeada.

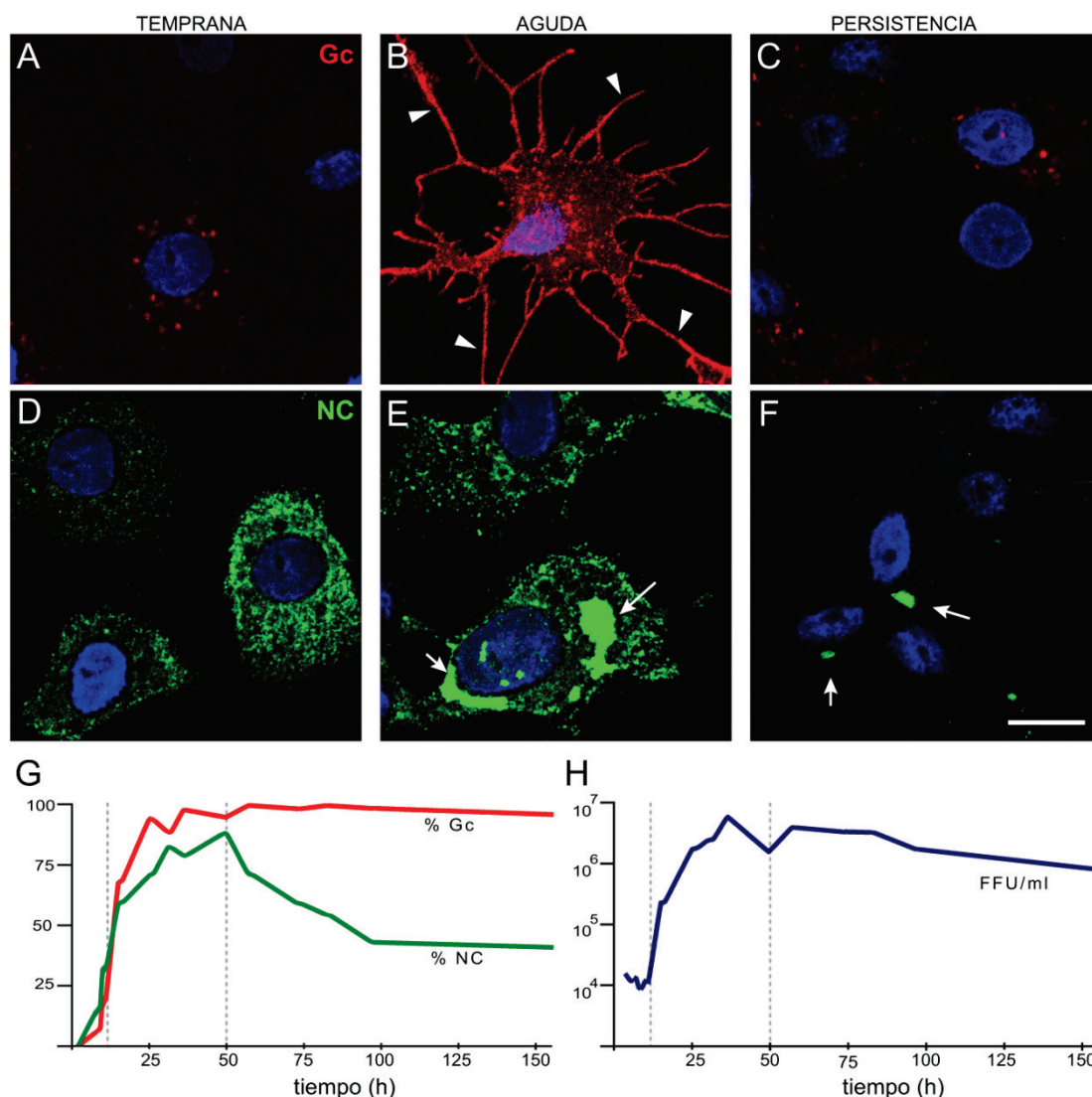


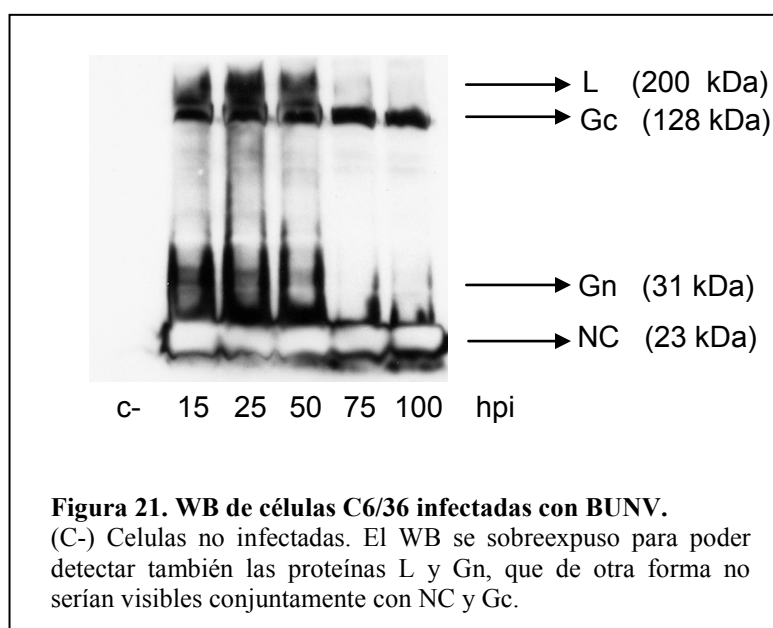
Figura 20. Dinámica del BUNV en células de mosquito C6/36. Titulaciones y porcentajes de infección.

(A-F) Proyecciones de imágenes confocales, se observan cambios en la distribución de Gc (rojo) y NC (verde) en las tres fases de la infección (temprana, aguda y de persistencia). Nucleos en azul. (A) y (D) Células infectadas a 10 hpi, (B) y (E) 15 hpi, y (C) y (F) 155 hpi. Las puntas de flecha blancas en (B) muestran como Gc se distribuye por las prolongaciones celulares que se inducen en la fase aguda. Las flechas blancas en (E) indican la acumulación de NC en los “N-bodies” y en (F) su progresiva condensación. (G) Porcentaje de células con marca de Gc (rojo) y NC (verde) a diferentes tiempos de infección. (H) Curva de crecimiento del virus. Las diferentes fases de la infección se representan entre líneas de puntos. Barras: 20 μ m.

Se realizaron recuentos del número de células con señal positiva de NC y Gc a los distintos tiempos post-infección. El porcentaje de células con marcaje de Gc fue aumentando progresivamente hasta llegar a casi el 100 % del cultivo. Sin embargo, el número de células con señal de NC alcanzó un pico máximo entre 31 y 49 hpi, pero

luego fue descendiendo para dejar de ser detectable en aproximadamente el 50 % de las células. Simultáneamente se observó una disminución progresiva del tamaño de los “N-bodies”, pasando a ser un foco apenas detectable en muchas de las células (figura 19 y 20).

También realizamos un WB con anticuerpos anti-BUNV de células infectadas a 15, 25, 50 75 y 150 hpi, en donde vimos que la cantidad de proteínas virales, que era máxima a 15 y 25 hpi, empezaba a disminuir a partir de 50 hpi (figura 21).



Tras el análisis conjunto de los fenómenos observados a lo largo de la infección, identificamos tres fases diferenciadas en el ciclo vital de BUNV en células C6/36.

- **Fase temprana:** Infección detectable en un bajo porcentaje de las células. Sin liberación activa de viriones infectivos y ni cambios en la morfología celular.
- **Fase aguda:** Aumento exponencial del porcentaje de células infectadas. Aumento exponencial de la curva de crecimiento del virus. Cambio drástico de la morfología celular. Máxima expresión de las proteínas virales.
- **Fase de persistencia:** Porcentaje estable de células con marcaje de Gc y disminución progresiva del porcentaje de células con NC detectable, que se encuentra, además, acumulada en los “N-bodies”. El título viral se mantiene constante. La morfología celular es similar a la de células no infectadas. Disminución de la expresión de las proteínas virales.

2. El BUNV induce cambios morfológicos en las células, provoca la formación de prolongaciones y un aumento de contactos intercelulares.

Como se ha visto en el punto anterior, durante la fase aguda de la infección las células modifican su morfología y parecen emitir prolongaciones que posibilitan nuevos contactos intercelulares.

Para analizar este fenómeno en detalle, se estudiaron por microscopía óptica de contraste de fases y contraste de interferencia diferencial (DIC) células control e infectadas a los distintos tiempos de post-infección mencionados en el apartado anterior (figura 22). A las 6 hpi las células mantenían todavía una forma redondeada similar a las de las células control. Es a partir de las 15 hpi cuando se empezaron a observar numerosas prolongaciones que daban a las células una apariencia estrellada. Desde las 57 hpi en adelante las células fueron recuperando una forma redondeada similar a la de células no infectadas.

Para evaluar la importancia de los microtúbulos en este proceso, realizamos IFA con anticuerpos frente a tubulina en células control e infectadas a 36 y 96 hpi. De esta forma se demostró la implicación del citoesqueleto de microtúbulos en la formación de las prolongaciones emitidas por las células infectadas. Estas prolongaciones, que contactaban células vecinas, no pueden confundirse con restos de la división celular ya que carecían de cuerpo medio (figura 22).

La actina, visualizada por microscopía confocal con la sonda específica faloidina, no se encontró en el interior de las prolongaciones, aunque se vio que las fibras de estrés eran más patentes durante la fase aguda de la infección (figura 23). Curiosamente, se observó en el citoplasma de células infectadas un patrón de actina de tipo punteado, muy similar al patrón de distribución de la proteína viral Gc, ausente en células control. Sin embargo, no fue posible evaluar la existencia de co-localización de estos dos elementos, ya que el marcaje con faloidina en células C6/36 infectadas fue posible únicamente si se realizaba con la sonda específica en ausencia de cualquier otro anticuerpo viral.

Vimos que estas prolongaciones no eran simples proyecciones citosólicas, sino que también contenían diferentes orgánulos y componentes virales en su interior. Mediante microscopía confocal se identificaron en células infectadas a distintos tiempos elementos del Golgi, lisosomas y mitocondrias, así como las proteínas virales Gc, NC, L y NSm. Las membranas del golgi y las proteínas Gc y NC se detectaron mediante IFA con anticuerpos específicos, los lisosomas y mitocondrias con sondas específicas. Las proteínas virales L y NSm se detectaron utilizando virus recombinantes con “tags” detectables (ya que no se dispone de buenos anticuerpos para estas proteínas) mediante

IFA con anti-V5, en el caso del rBUNL4-V5, o por detección directa de la EGFP, en el caso del rBUNM-NSm-EGFP (descritos en materiales y métodos) (figura 24).

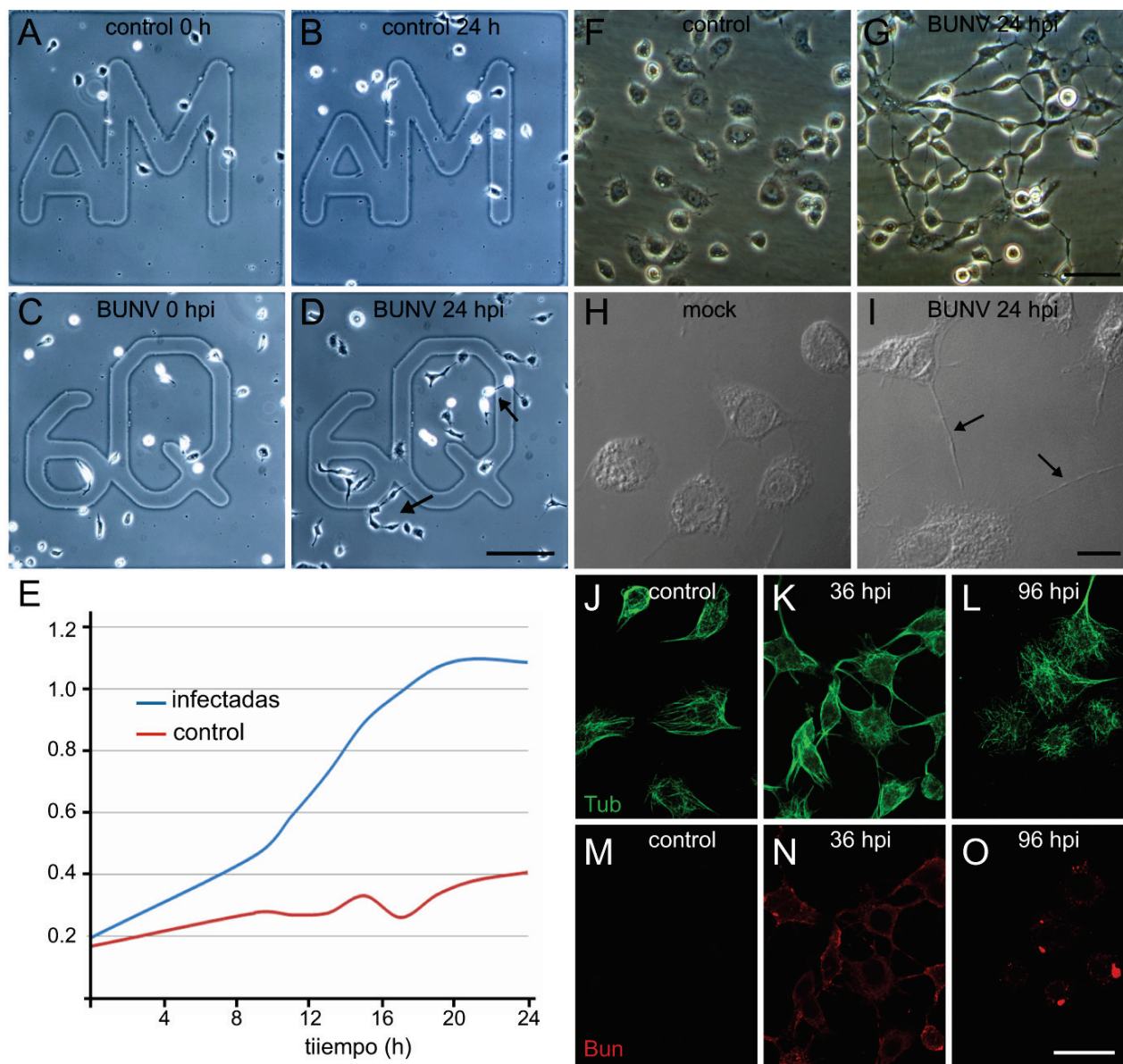
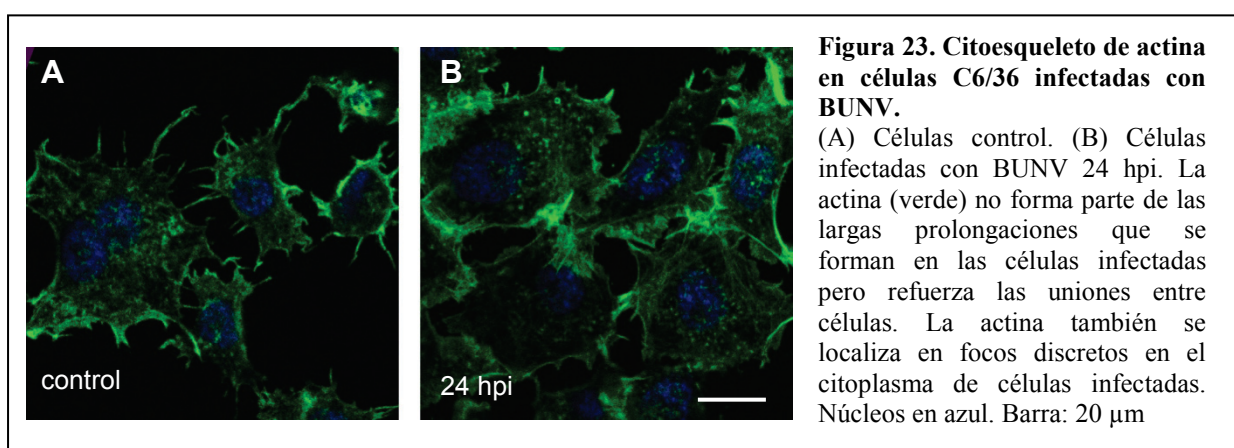


Figura 22. Células C6/36 infectadas con BUNV emiten finas prolongaciones que producen nuevos contactos intercelulares.

(A-D) Microscopía de contraste de fases de células crecidas en placas de cultivo con fondo cuadrículado y numerado, tanto control (A y B) como infectadas (C y D) a 0 (A y C) y 24 h (B y D). En células infectadas tras 24 h (D) se forman prolongaciones y se establecen nuevos contactos intercelulares (flechas negras). (E) Cuantificación de los contactos intercelulares. (F y G) Imágenes a mayor magnificación de células control (F) e infectadas (G) donde se observan los cambios en morfología y la formación de nuevas conexiones intercelulares. (H e I) Imágenes DIC en donde se muestran en detalle las finas prolongaciones (flechas negras). (J-O) Imágenes de microscopía confocal en donde se muestra la reorganización de la tubulina (verde) en células infectadas marcadas con anti-BUNV (rojo) a diferentes tiempos postinfección. Barras: 250 μ m en (A-D), 50 μ m en (F y G), 10 μ m en (H e I) y 20 μ m en (J-O).

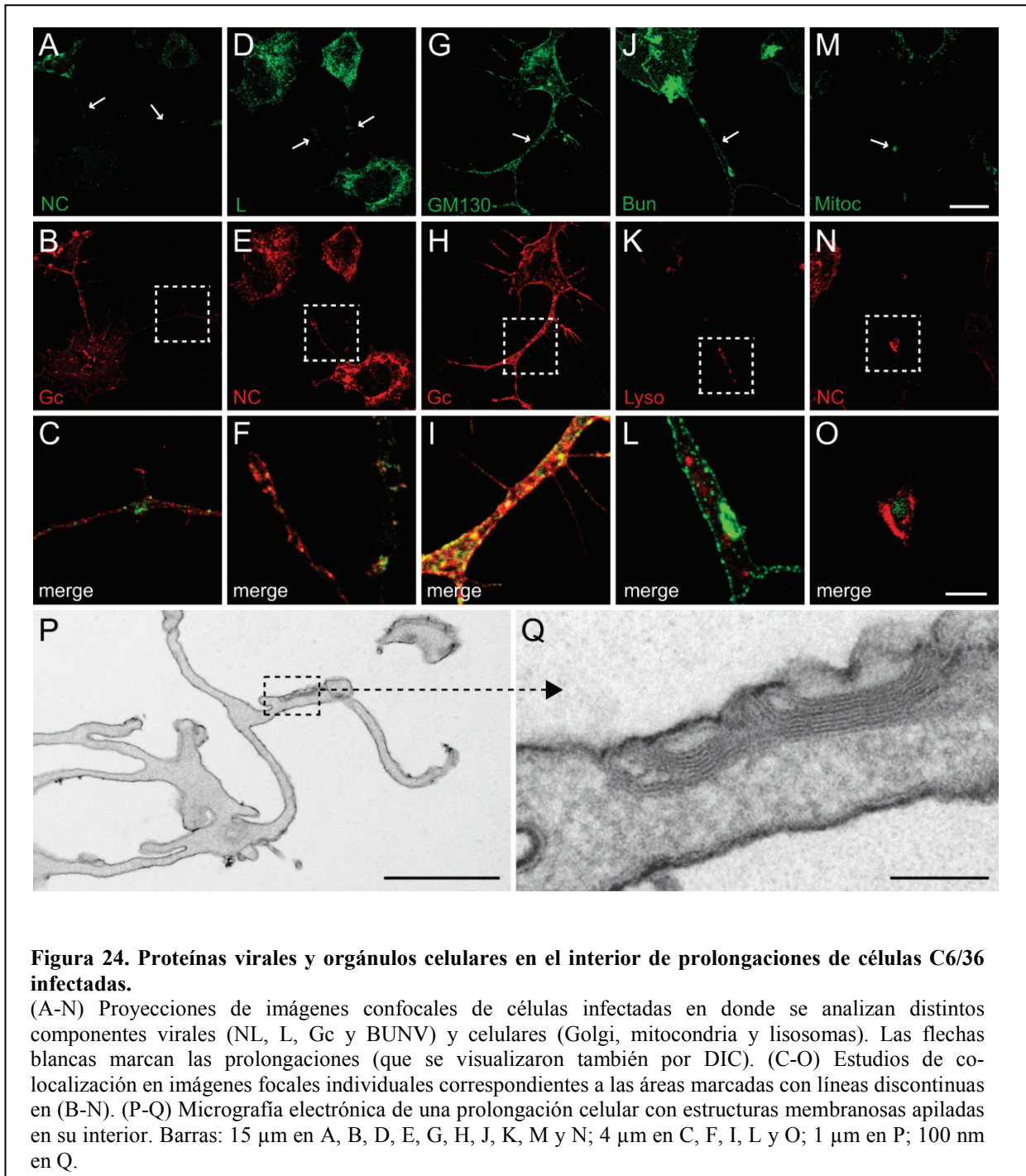
Para estudiar la ultraestructura de las prolongaciones mediante TEM, se realizaron cortes orientados paralelos al sustrato de células en la fase aguda de la infección y que estaban crecidas en monocapa; las monocapas habían sido previamente incluidas en resina EML-812. Las prolongaciones que emiten las células infectadas se encuentran adheridas al sustrato, por lo que se observaron únicamente en las primeras secciones ultra-finas obtenidas, las correspondientes a la parte basal de las células. En el interior de las prolongaciones se encontraron eventualmente mitocondrias, lisosomas y, sobre todo, cisternas del aparato de Golgi, en consonancia con los resultados obtenidos por microscopía confocal. Sin embargo, tras un barrido extenso de cortes basales de más de 5000 células no se pudo demostrar la presencia de partículas virales intracelulares en el interior de las prolongaciones (figura 24).

Se realizaron estudios de microscopía de célula viva para estudiar la dinámica de estas prolongaciones. Se realizó video-microscopía de células infectadas en un intervalo de 15 h (desde las 20 hpi hasta las 35 hpi), tomando imágenes cada 5 min, con un BUNV recombinante con eGFP insertada en la proteína NSm, rBUN-NSm-eGFP. La proteína no estructural NSm está involucrada en morfogénesis y su comportamiento en células de mosquito es similar a la descrita para las proteínas estructurales. En los videos obtenidos se pudo observar que las prolongaciones no eran elementos rígidos y estáticos, sino altamente móviles y dinámicos, por donde la proteína NSm-eGFP se desplazaba con movimientos de tipo pulsátil u ondulatorio. En algunas de las secuencias se vio que la señal fluorescente era incluso capaz de transferirse entre células en contacto (figura 25).



Para estudiar los contactos intercelulares en células infectadas, se cuantificó el número de contactos a lo largo del tiempo tanto en células control como en células infectadas, y se analizó la motilidad celular. Estos estudios se realizaron tomando imágenes de contraste de fases de células vivas en cultivo, crecidas en cubre-objetos con

fondo cuadriculado y numerado, a distintos tiempos (0, 1, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 24 h). Para cada tiempo, se hicieron recuentos de contactos en 20 áreas de la cuadrícula escogidas al azar, observándose un aumento significativo en el caso de células infectadas mientras que en células control permanecieron estables. Ya que 2 es el número mínimo de células que se requieren para el establecimiento de un contacto intercelular, el índice de contactos se definió como el número de contactos intercelulares dividido entre la mitad del número de células (figura 22 E).



Con estos experimentos vimos también un claro aumento de la movilidad de las células infectadas con respecto a células control. Los movimientos eran principalmente de acercamiento progresivo de células previamente unidas por prolongaciones. En células control e infectadas la tasa de división fue similar.

En resumen, en células infectadas se producen nuevos contactos a través de la emisión de prolongaciones que sirven de guía para un acercamiento progresivo, hasta situarse las células completamente adyacentes entre sí. Estos contactos permiten el intercambio de orgánulos celulares y proteínas virales entre células pero no se ha detectado el transporte de partículas virales.

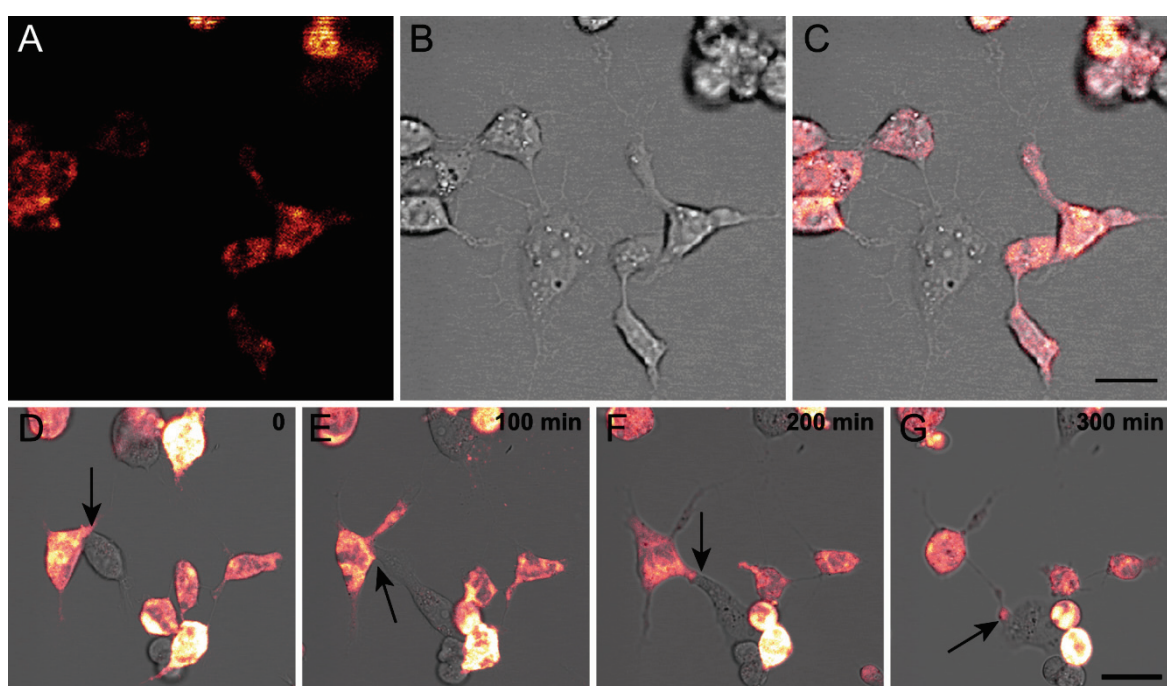


Figura 25. Video-microscopía de células C6/36 infectadas con rBUNM-NSm-EGFP.

La señal fluorescente de EGFP se ha editado con el software LAS AF para una mejor visualización. (A-C) Células fluorescentes rodeando y contactando una célula no fluorescente que ya exhibe una morfología estrellada, en (A) se muestra la señal fluorescente, (B) es DIC y (C) la proyección de ambas. (D-G) Células infectadas a distintos tiempos. Se ve la formación de una prolongación (flecha negra) entre una célula fluorescente y otra no fluorescente. En (G) se observa la transferencia de material fluorescente entre ambas células. Barra: X en (A-C) y 25 μ m en (D-G).

3. Acumulación de proteína viral NC en el citoplasma: Formación de “N-bodies”.

Como hemos descrito en el primer punto, la fase de persistencia se caracteriza, entre otros factores, por la presencia de zonas en el citoplasma en donde se acumula la proteína de la nucleocápside, en los “N-bodies”. En un primer momento NC se

encuentra dispersa por todo el citoplasma y gradualmente, durante la fase aguda, empieza a acumularse en localizaciones perinucleares concretas. La formación de “N-bodies” ocurre simultáneamente a la desaparición progresiva de su localización citoplasmática difusa. Los “N-bodies” van fusionándose hasta formar una sola estructura en la fase de persistencia. Entonces, van haciéndose paulatinamente más pequeñas hasta que llegan a ser indetectables en muchas de las células. Es posible identificar los “N-bodies” mediante microscopía DIC, ya que se visualizan como zonas de alta densidad en el citoplasma (figura 26.)

En los experimentos de IFA descritos en el apartado primero de resultados no se observó co-localización de NC con Gc o NSm. Con este resultado se descartó que los “N-bodies” fuesen zonas de ensamblaje viral o acumulaciones de virus intracelulares.

Para averiguar si la polimerasa viral formaba parte de los “N-bodies” utilizamos el virus recombinante rBUNL4-V5. Analizando los tiempos de post-infección óptimos para visualización de los “N-bodies”, vimos que la co-localización de L y NC en los “N-bodies” era total (figura 26).

Realizamos inmunomarcajes con anti-NC en secciones ultra-finas de células infectadas tras 48 hpi y células control, criosustituidas e incluidas en Lowycri[®] K4M, y se visualizaron por TEM. Estos inmunomarcajes desvelaron la existencia de zonas muy definidas en el citoplasma marcadas intensa y específicamente con el oro coloidal conjugado con el anticuerpo secundario. Frecuentemente, las partículas de oro coloidal, dibujaban formaciones lineares que sugerían la asociación de NC con filamentos o membranas. Los “N-bodies” no parecían estar rodeados por membranas celulares.

Tras la información obtenida con estos inmunomarcajes, los “N-bodies” fueron fáciles de identificar bajo el ME cuando se hicieron estudios ultraestructurales detallados mediante TEM de secciones ultra-finas de células infectadas incluidas en resina EML-812, a tiempos de post-infección óptimos para la visualización de los “N-bodies”. Estas estructuras se visualizaron como zonas “vacías” en el citoplasma con bordes bien definidos. En su interior no se encontró una estructura organizada, sino únicamente algunos gránulos similares a ribosomas. Se corroboró también la ausencia de membranas que encapsulasen los “N-bodies” a modo de vacuolas. Sin embargo, si estaban rodeados por elementos del RER, que recorrían todo el perímetro. También se vio un gran número de mitocondrias, vacuolas y cisternas del Golgi en la periferia (figura 26).

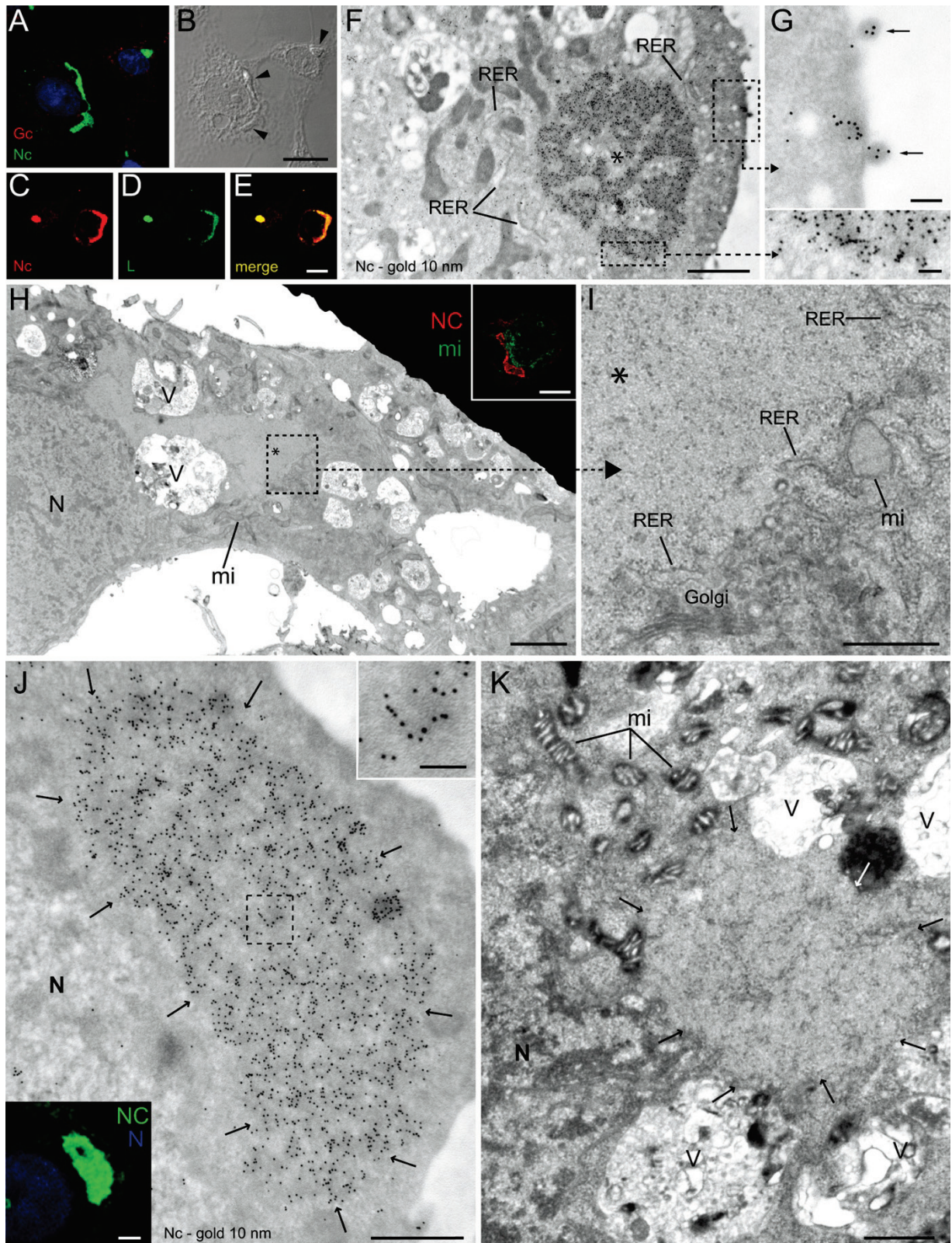


Figura 26. “N-bodies” de células C6/36 en fases tardías de la infección.

(A) Microscopía confocal en donde aparecen 2 “N-bodies” (verde) de diferente tamaño cerca del núcleo (azul). Gc en rojo. (B) Mediante microscopía DIC se puede apreciar la densidad de los “N-bodies” (punta de flecha). (C-E) Análisis de co-localización de NC (rojo) y L (verde) mediante microscopía confocal de células infectadas (co-localización positiva en amarillo). (F) Inmunomarcaje de NC con anticuerpos conjugados con oro coloidal. Algunas regiones están intensamente marcadas mientras que otras permanecen sin marca (*).

(G) Alta magnificación de las áreas dentro de los recuadros de líneas discontinuas. Se muestran 2 VE marcados con anti-NC en el cuadro superior (flechas) y una región detallada del “N-body” (abajo). (H) Ultraestructura de una célula con un “N-body” de gran tamaño, en un campo a baja magnificación se puede ver que el “N-body” contiene material de baja densidad electrónica (*) rodeado de grandes vacuolas (V) y mitocondrias (mi). En el recuadro interior se muestra por microscopía confocal que las mitocondrias se encuentran en la periferia del “N-body”. (I) Detalle a mayor magnificación del recuadro en (H), se puede ver la estructura interna de tipo granular y cómo está rodeado por orgánulos, especialmente RER. (J) “N-body” marcado con anti-NC (rodeado por flechas), en el cuadro interior superior se aprecian agregados lineales de anti-NC, en el cuadro inferior una imagen confocal similar para una mejor correlación. (K) Micrografía de una sección ultra-fina mostrando la ultraestructura de un “N-body” completamente rodeado por mitocondrias y grandes vacuolas. Las flechas marcan la periferia del “N-body”. G:Golgi, N:núcleo, mi:mitocondrias. Barras: 10 μ m en (A-E), 1 μ m en (F), 100 nm en (G) y recuadro superior en (J), 2 μ m en (H) y recuadro superior en (J), 0,5 μ m en (I-K).

4. El aparato de Golgi es el sitio de ensamblaje del BUNV en células C6/36.

Como ya se ha descrito en la introducción, el BUNV utiliza para su ensamblaje las membranas del aparato de Golgi en células de mamífero (Salanueva y cols., 2003; Novoa y cols., 2005 b). A pesar de que se presuponía que el sitio de ensamblaje viral sería el mismo en células del vector artrópodo, no se tenía información al respecto.

Para probarlo, se realizaron análisis de co-localización mediante IFA y microscopía confocal. Como marcador del compartimento de ensamblaje se utilizó la glicoproteína viral Gc y como marcador del aparato de Golgi una batería de anticuerpos frente a proteínas residentes de la parte *cis* y *medial* que están descritos que presentan reactividad cruzada con los epítomos análogos en células C6/36 (anti-GM130, anti-p115, anti-AP3 y anti-MG160) (Nakamura y cols., 1995; Lowe y cols., 1998; Kondylis y cols., 2001). En la figura 27 se muestra únicamente el anti-GM130, los demás daban un patrón idéntico.

En células C6/36 control, los marcadores del Golgi se localizaron distribuidos por todo el citoplasma, mostrando un patrón punteado, a diferencia del típico patrón perinuclear en forma de media luna que se observa en células de mamífero, hecho característico de células de mosquito en estado larvario (Kondylis y cols., 2001; LaJeunesse y cols., 2004; Yano y cols., 2005). Esto se corresponde con los estudios ultraestructurales mediante TEM realizados en células control incluidas en EML-812, en los que no se pudieron identificar grandes dictiosomas perinucleares sino regiones ricas en vesículas o algunas cisternas apiladas de pequeño tamaño (figura 27).

Con los ensayos IFA y microscopía confocal, corroboramos que el BUNV utiliza las membranas del aparato de Golgi en células C6/36 para la adquisición de su envuelta viral, ya que se vio co-localización de Gc con los tres marcadores del aparato de Golgi.

Vimos, además, que en el tiempo de post-infección analizado (24 hpi) se producía una redistribución de las vesículas derivadas del Golgi hacia las prolongaciones celulares de la misma forma que el patrón de distribución observado para Gc (figura 27).

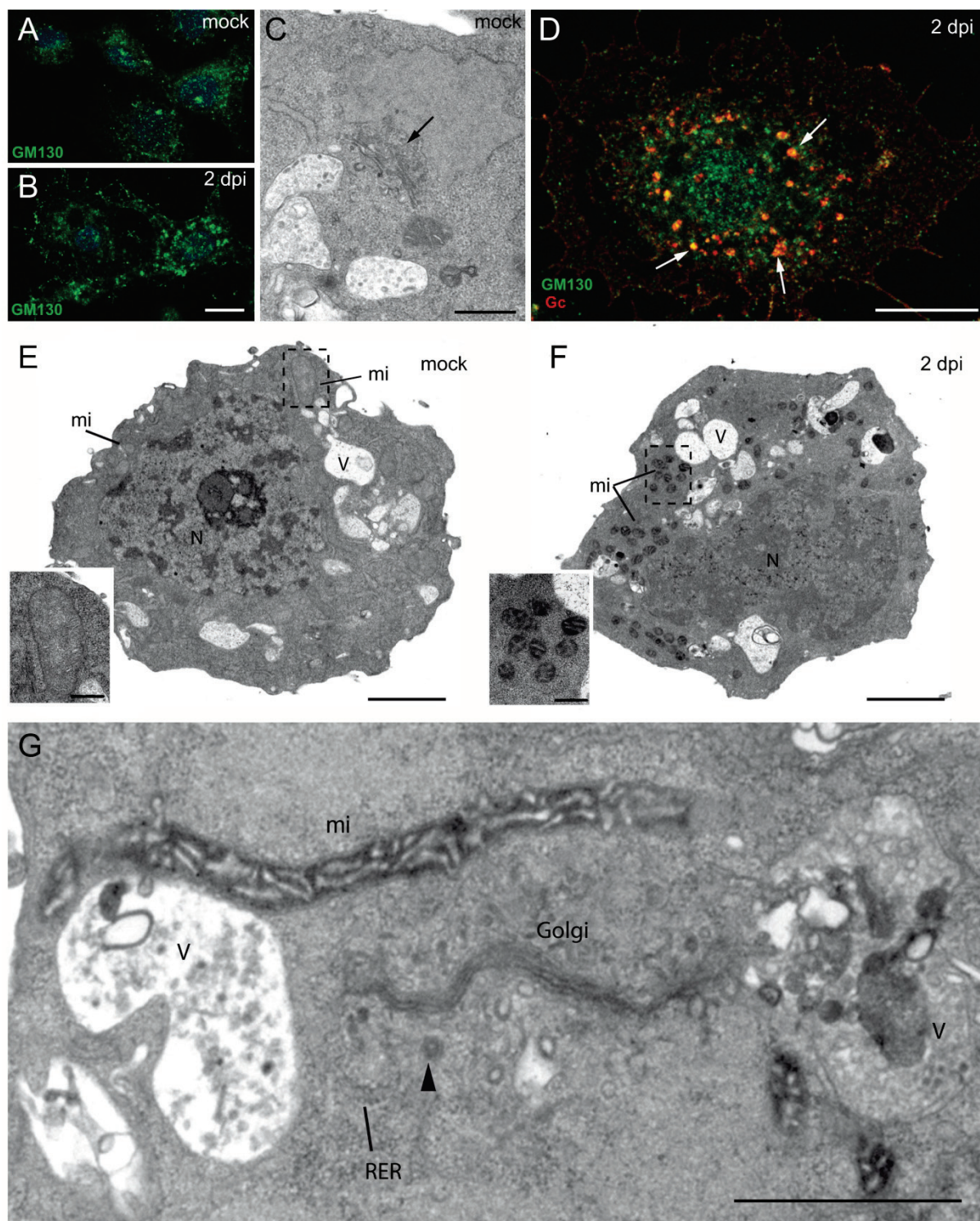


Figura 27. Mini-factorías virales de BUNV en células de mosquito C6/36 en la fase aguda de la infección.

(A) y (B) Proyecciones de planos confocales donde se ve el Golgi en células control e infectadas 2 dpi respectivamente. (C) Ultraestructura del Golgi, se aprecia un pequeño dictiosoma. (D) La co-localización de

Gc (rojo) y Golgi (verde) sugiere la formación de varias mini-factorías (flechas blancas) en células infectadas. (E) y (F) Microscopía electrónica del cuerpo celular de una célula control e infectada respectivamente, en los recuadros se pueden ver las mitocondrias condensadas en células infectadas. (G) Ultraestructura de una mini-factoría viral con un dictiosoma de Golgi rodeado de orgánulos. La punta de flecha señala una partícula viral. V: vacuola, mi: mitocondria. Barras: 10 μm en (A), (B) y (D); 0,5 μm en (C) y recuadros en (E) y (F); 2 μm en (E) y (F) y 1 μm en (G).

5. Factoría viral y morfogénesis del BUNV en células C6/36.

Creemos que un factor decisivo para los diferentes desenlaces provocados por el BUNV en células de mosquito o células de mamífero, podría ser un uso diferente de las endomembranas intracelulares. La menor citopatogenicidad del virus en células de mosquito podría ser un reflejo de una diferencia en la morfogénesis viral.

Como hemos descrito en la introducción, el virus BUNV en células de mamífero se ensambla por gemación en las membranas del Golgi, en torno al cual se organiza la factoría viral. La factoría viral es un reclutamiento de mitocondrias y RER alrededor del aparato de Golgi, que se compacta, mientras que el citoesqueleto de actina se retira. En estas factorías se produce también la replicación del virus en complejos replicativos que se localizan en vesículas o esférulas, unidas a una estructura tubular la cual parece conectar la replicación con el ensamblaje del virus (Fontana y cols, 2008).

Las partículas virales se acumulan en el lumen del Golgi, provocando su progresiva dilatación. Más tarde, se produce una dramática fragmentación de este sistema de membranas por lo que se produce un bloqueo de las funciones celulares dependientes del Golgi. Sin embargo, el ensamblaje viral en células de mosquito es diferente y en la figura 28 se resumen las principales diferencias observadas entre células de mamífero y mosquito.

En esta tesis, nos propusimos realizar una descripción ultraestructural de la infección del BUNV en células de mosquito que nos permitiese establecer una comparación con lo que ocurre en células de mamífero. Para una correcta interpretación de las etapas de ensamblaje y maduración del virus a nivel ultraestructural, caracterizamos primero las células C6/36 control mediante el estudio de inclusiones convencionales en resina EML-812. Estas células exhibían una morfología redondeada, presentando un núcleo central y nucléolos patentes, RER y mitocondrias de apariencia normal y un aparato de Golgi fragmentado, en forma de aéreas de alta concentración de vesículas o pequeños dictiosomas; las células presentaron también multitud de vacuolas de gran tamaño, contenido variable y una ultraestructura que recordaba a la de cuerpos multivesiculares. Estas vacuolas contenían en su mayoría pequeñas vesículas de tamaño y forma similar al BUNV, por lo que es importante conocer que esas vesículas no son de origen viral y son características de células no infectadas (figura 27).

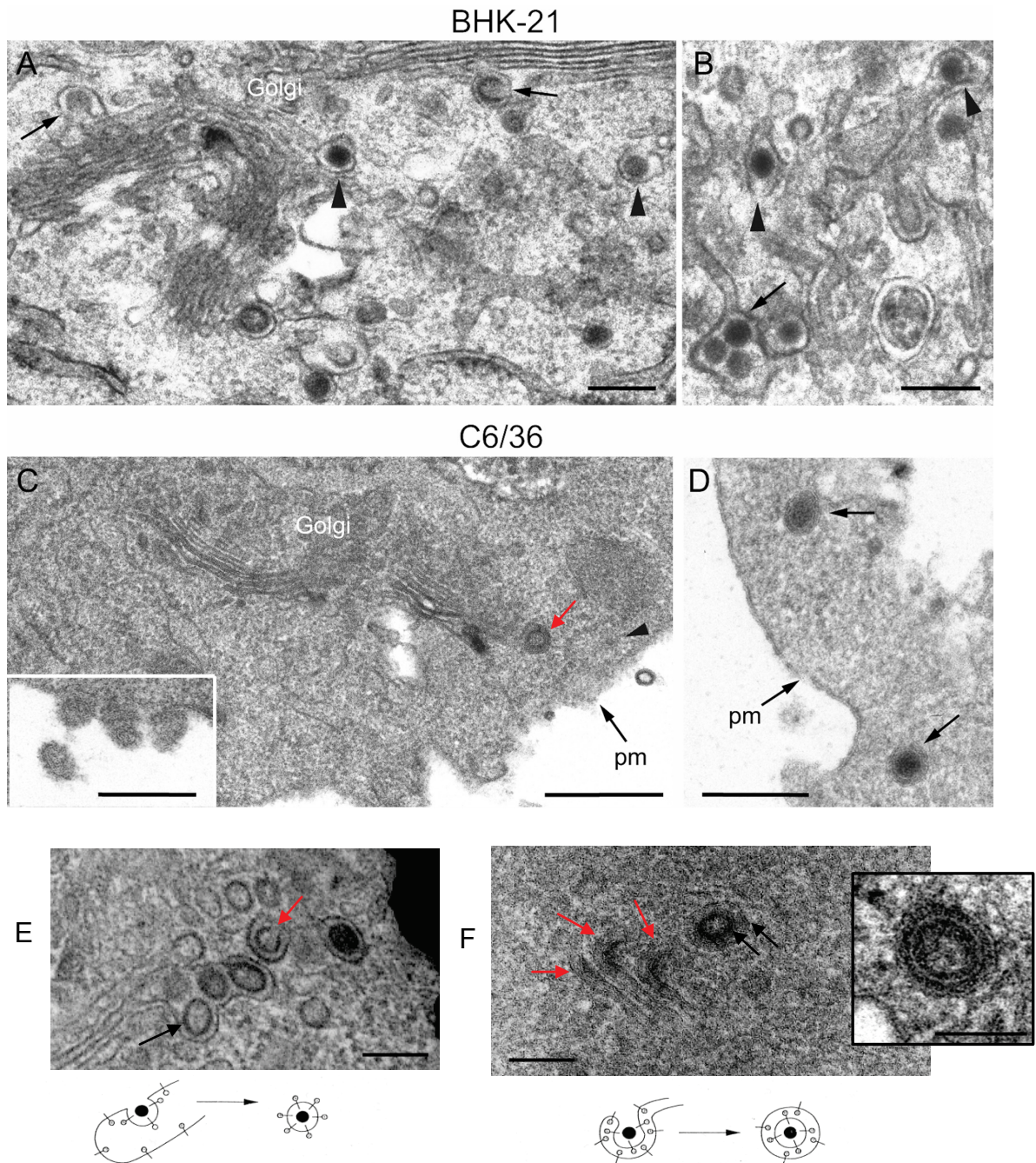


Figura 28. Compartimentos de ensamblaje del BUNV en células BHK-21 y C6/36.

(A) y (B) Células de mamífero infectadas. Se observan perfiles de gemación (“budding”) en membranas del Golgi indicados por flechas negras en (A) y partículas virales en el lumen de cisternas dilatadas de Golgi (puntas de flecha en A y B). La flecha en (B) señala un grupo de virus en el compartimento *trans*-Golgi. (C) y (D) Células de mosquito infectadas. (C) Dictiosoma de Golgi periférico con una partícula viral (flecha roja), el recuadro muestra un grupo de VE liberados adheridos a la superficie celular. (D) Micrografía electrónica en donde se muestran 2 virus intracelulares densos libres en el citoplasma cerca de la membrana plasmática. pm: membrana plasmática. (E) Ensamblaje por gemación (“budding”) en células de mamífero. La flecha roja indica un virus que se está ensamblando. Los virus así ensamblados adquieren una membrana (flecha) y se acumulan en el lumen del Golgi. (F) Ensamblaje por envolvimiento (“wrapping”) en células de mosquito, se pueden observar 3 perfiles de ensamblaje en membranas del Golgi (flechas rojas). Los virus así ensamblados adquieren una doble membrana (flechas) y viajan por el citoplasma hacia la membrana plasmática. En el recuadro se puede ver un virus con doble envuelta a mayor magnificación. Barras: 200 nm en A-F y 100 nm en el recuadro de F.

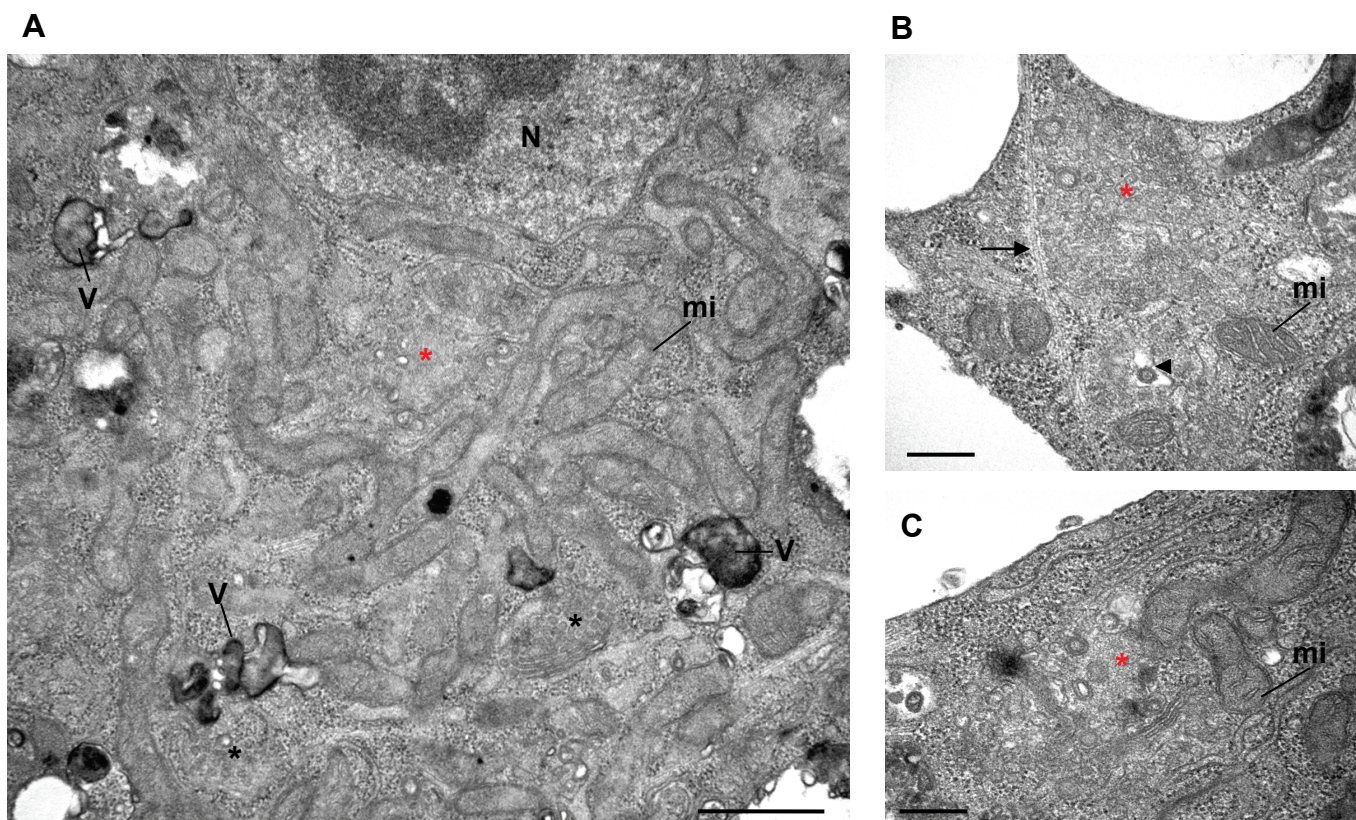


Figura 29. Ejemplos de factorías virales del BUNV en células de mosquito C6/36 en la fase aguda de la infección.

(A) Mini-factoría viral (*) en posición yuxtannuclear con virus intracelulares (N:núcleo) rodeada por multitud de mitocondrias (mi) y vacuolas (V). En la zona inferior de la imagen se pueden ver más mini-factorías (*). (B) y (C) Mini-factorías en posición periférica muy cercanas a la superficie celular (*) con virus intracelulares. La flecha en (B) apunta a un microtúbulo, la punta de flecha muestra un VE. Barras: 1 μ m en A, 300 nm en B y C.

Los estudios previos existentes de caracterización ultraestructural de células C6/36 son muy escasos. Por su morfología son similares a hemocitos de tipo granulocito en mosquitos (Hillyer y Christensen, 2002) y otros invertebrados (Butt y Shields, 1996; Brayner y cols., 2004). En estos granulocitos, muchas de las vacuolas tienen función defensiva (Mitta y cols., 1999).

Para describir la morfogénesis del BUNV en células de mosquito, se estudiaron por TEM células, infectadas durante la fase aguda, incluidas en resina EML-812 por métodos convencionales (inclusión de agregados celulares o “pellets”). Después de un largo estudio se obtuvieron resultados infructuosos. Se identificaron un número muy escaso de partículas virales y no se vieron efectos citopáticos evidentes, aunque si se observó una condensación de las mitocondrias. No se pudieron establecer diferencias evidentes entre células control e infectadas. Por ello, se decidió pasar al estudio de cortes orientados paralelos a la base de células crecidas en forma de monocapa. Esta

técnica permite el análisis completo de células eucariotas sin la pérdida de elementos intracelulares escasos o distribuidos de forma no aleatoria (Fontana y cols., 2008).

Se estudiaron por esta técnica más de 5.000 células infectadas abarcando todo su volumen, desde la base hasta la parte más apical.

En la fase aguda de la infección (15 y 25 hpi) se vieron muy pocas partículas virales ensamblándose o asociadas a endomembranas, localizándose la mayoría de ellas muy cerca de la superficie celular. Las factorías virales se identificaron en las primeras secciones ultrafinas, es decir, la zona basal de las células. A diferencia de la factoría en células de mamífero en las que se ensambla una única estructura perinuclear y de gran tamaño, en células C6/36 no existe una factoría viral como tal, sino una multitud de pequeñas factorías (figura 27 y 29). Estas mini-factorías se componen de mitocondrias, elementos del RER y vacuolas reclutadas alrededor de dictiosomas de Golgi de pequeño tamaño, tienen localización periférica y no se produce en ellas la acumulación de partículas virales, ya que se encontraron de media 1 o 2 virus en su interior. En las factorías se vieron pocas partículas ensamblándose, pero las que se identificaron lo hacían por envolvimiento (“wrapping”) en las membranas del Golgi, de forma que adquirirían una doble membrana (figura 28).

La mayoría de los virus intracelulares, que además se localizaban muy cerca de la superficie de la célula, estaban unidos a unas estructuras filamentosas de naturaleza desconocida. Debido a los pocos virus intracelulares encontrados es difícil identificar las distintas etapas de maduración, pero parece que los virus no se acumulan en el interior celular, sino que se liberan rápidamente tras su ensamblaje.

En tiempos correspondientes al final de la fase aguda o principio de la fase de persistencia (49 y 57 hpi) se visualizaron los “N-bodies” (descritos previamente en el punto 3), se encontraron procesos de autofagocitosis y de excreción del contenido de vacuolas al entorno extracelular (figura 30).

En la fase de infección persistente (82 hpi) se dejaron de identificar “N-bodies” y fue más difícil encontrar partículas virales en el interior celular. Las células tenían un menor número de vacuolas y el citoplasma tenía una apariencia más homogénea, con un menor número de vacuolas.

Estas observaciones se corroboraron mediante microscopía confocal de células C6/36 infectadas tratadas con una sonda fluorescente específica de compartimentos endo-lisosomales ácidos (Lysotracker®). Se vio cómo aumentaba el número y tamaño de vacuolas ácidas en la fase aguda de la infección, mientras que disminuían en número y tamaño en las fases más tardías (figura 30).

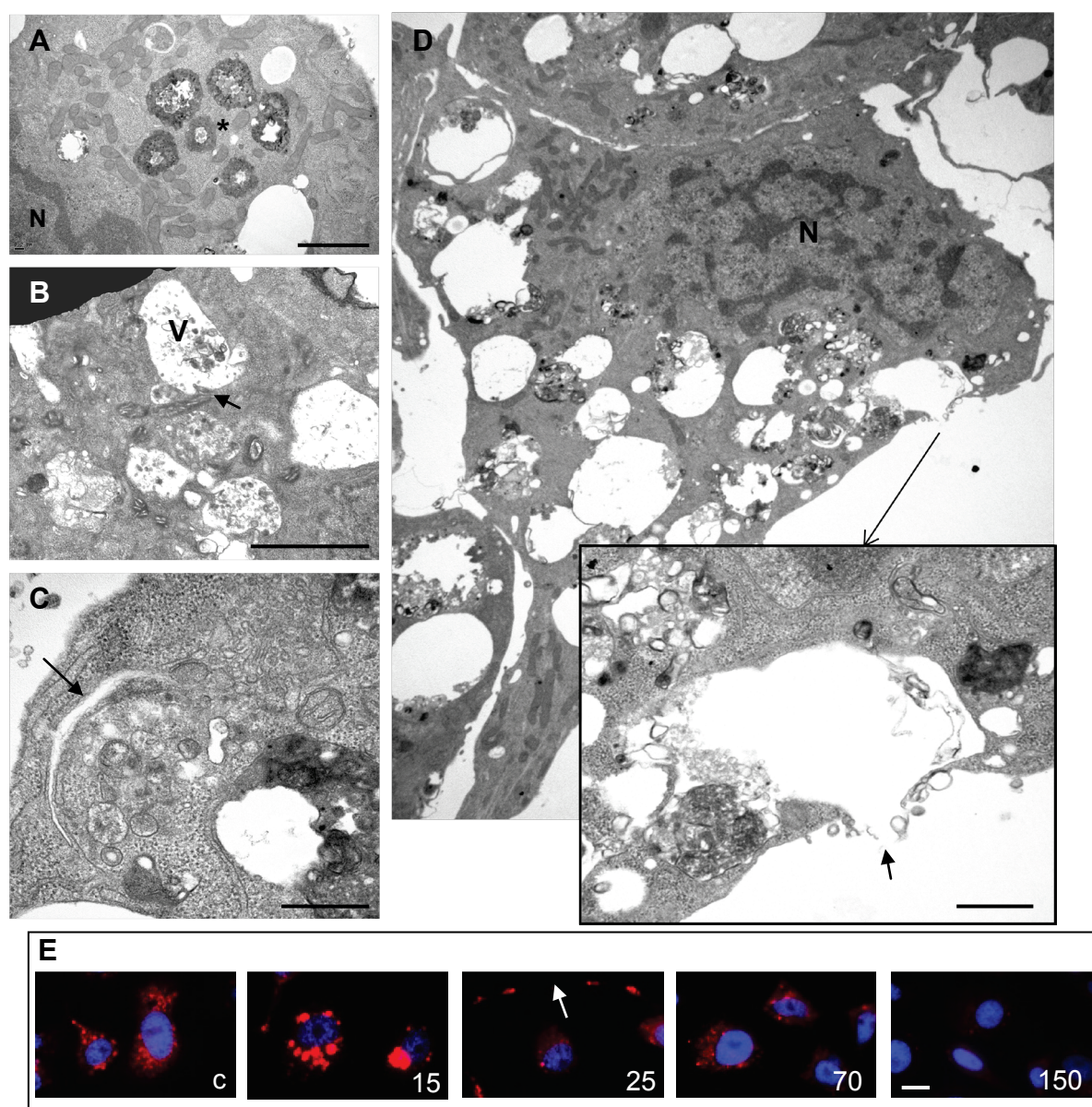


Figura 30. Autofagocitosis y lisosomas en células de mosquito C6/36 infectadas con BUNV.

(A-D) Microscopía electrónica de secciones orientadas. (A) Región en el citoplasma de una célula infectada con una acumulación de vacuolas de contenido denso (*). A su vez, esta área está rodeada de mitocondrias. (B) Mitocondria en una célula infectada (flecha) siendo aparentemente engullida por una vacuola (V). (C) Perfil de media luna típico de la formación de autofagosomas (flecha), que parece englobar material heterogéneo en el citoplasma. (D) Célula infectada con multitud de vacuolas, en el zoom del área seleccionada se puede ver cómo el contenido de una de ellas se libera al exterior de la célula (flecha). (E) Microscopía de epifluorescencia en donde se muestra la dinámica de los compartimentos ácidos (rojo) durante la infección. Se observa como a las 15 hpi estos compartimentos son muy grandes y abundantes en comparación con las células no infectadas (c), a las 25 hpi se ve una proyección celular con lisosomas en su interior (flecha). A las 150 hpi el número y tamaño de los lisosomas está muy reducido. Núcleos en azul. Barras: 2 μ m en A, 500 nm en C y en el recuadro en D, 1 μ m en B, 20 μ m en E.

En resumen, en células de mosquito los virus no se acumulan en el interior de compartimentos dilatados del aparato de Golgi, sino que se liberan rápidamente tras el ensamblaje. Las factorías virales son múltiples, periféricas y de pequeño tamaño, en lugar de una única estructura grande y yuxtannuclear como en células de mamífero. En células de mosquito, durante la fase aguda de la infección, los virus se ensamblan mediante envoltimiento (“wrapping”) en lugar de mediante gemación (“budding”) y la infección va acompañada de una proliferación de lisosomas y vacuolas acídicas que disminuyen a tiempos tardíos.

6. La estructura y composición de los viriones del BUNV es diferente en virus generados por células de mamífero o células de mosquito.

La caracterización bioquímica y estructural de viriones BUNV producidos durante la infección en células de mamífero, así como los cambios producidos durante la maduración de las partículas virales, fue estudiada anteriormente en nuestro laboratorio (Novoa y cols., 2005 b).

En resumen, las glicoproteínas de la envuelta (Gc y Gn) del virión formado en células de mamífero presentan azúcares unidos a asparagina (N-glicanos) de tipo híbrido. Es decir, que presentan una combinación de glicanos de tipo complejo, con residuos de ácido siálico, galactosa o N-acetilglucosamina, con glicanos ricos en manosa. En concreto, la glicoproteína Gc presenta dos sitios de N-glicosilación y Gn uno (Lees y cols, 1986).

Los glicanos de alto contenido en manosa también se denominan de tipo inmaduro, ya que indican la ausencia del procesamiento enzimático típico que sufren las glicoproteínas al atravesar el dictiosoma del Golgi para llegar al sub-compartimento del *trans*-Golgi (Novoa y cols., 2005 b). Este es el tipo de azúcares que están presentes en los VI que se forman en células de mamífero, ya que se ensamblan en la parte *cis* del dictiosoma. Las glicoproteínas con azúcares de tipo complejo también se denominan de tipo maduro, ya que para alcanzar ese estado han debido atravesar transversalmente de *cis* a *trans* el dictiosoma del aparato de Golgi, en donde diferentes enzimas manosidasas y glicosiltransferasas transforman los glicanos de alto contenido en manosa (inmaduros) en restos azucarados de bajo contenido en manosa (con residuos como ácido siálico, galactosa o N-acetil glucosamina). Este tipo de azúcares maduros, junto con un porcentaje de azúcares que permanecen inmaduros por la imposibilidad de acceso de las enzimas del Golgi a la totalidad de las glicoproteínas integradas en la partícula viral, son los que presentan los VII y los VE en células de mamífero, ya que la maduración viral se produce a lo largo de su paso a través del aparato de Golgi antes del paso de los nuevos virus a las vesículas de secreción (Novoa y cols., 2005 b).

En general, la composición de las glicoproteínas de la envuelta viral es un factor importante en la estructura final del virión, y es importante no sólo para la conformación estructural de las moléculas de proteína sino también para la interacción con las otras glicoproteínas de la envuelta. De hecho, la estructura e infectividad de las partículas virales ensambladas en células de mamífero también va variando a lo largo del proceso de maduración. Los VI tienen forma redondeada y baja infectividad (1/50.000), los VII son más angulosos y presentan infectividad moderada (1/1.600), y los VE tienen forma icosaédrica, corona de espículas y alta infectividad (1/40) (Novoa y cols., 2005 b).

Para realizar un estudio comparativo del estado de glicosilación de las glicoproteínas de la envuelta de virus extracelulares generados en células de mosquito, con el de los virus extracelulares producidos por células de mamífero realizamos ensayos de digestión con la enzima endoH, que digiere N-glicanos de tipo complejo. Para ello se incubaron alícuotas de viriones previamente purificados de células C6/36 y BHK-21, seguidas de PAGE-SDS. En estos ensayos, además de corroborar la naturaleza híbrida de los glicanos de Gc en viriones generados en mamífero, vimos que la proteína Gc de los viriones de células de insecto contenía azúcares de tipo inmaduro, ya era totalmente sensible a la acción de la endoH.

Para visualizar inequívocamente la banda correspondiente a la glicoproteína Gn, se realizó un WB con anti-BUNV tras una PAGE-SDS. Curiosamente, sin realizar ningún ensayo previo, el peso molecular aparente de la glicoproteína Gn de viriones generados en C6/36 era menor que la de su homóloga en células de mamífero, BHK-21 o Vero. Quisimos comprobar si esta diferencia de tamaño venía dada por una ausencia o modificación de glicosilación, para lo que realizamos una incubación de fracciones de virus purificados en C6/36 y BHK-21 con la enzima PNGasaF, que digiere prácticamente cualquier tipo de glicano unido a asparagina independientemente de su composición. Sin embargo tras las incubaciones, las bandas correspondientes a Gn dejaban de ser detectables por WB. Esto podría explicarse por un aumento de la sensibilidad a la degradación debido a la pérdida de la rama glicosilada. Podríamos, además, atribuir la diferencia de tamaño de las glicoproteínas Gn al diferente estado de glicosilación, asumiendo que sería similar a lo que ocurría con Gc (figura 31).

Para determinar si esta diferencia en la composición de glicanos se acompañaba también de una estructura diferente, realizamos una comparación de ambos tipos de viriones, previamente purificados en células C6/36 y BHK-21, mediante TN con AcUr y PTA, y visualización por TEM. En la figura 32 se puede ver que los VE que se purificaron en células de insecto eran más sensibles que los de células de mamífero a los agentes de tinción apareciendo más deformados, mientras que los de células de mamífero permanecían con morfología más compacta y regular. Además, era muy

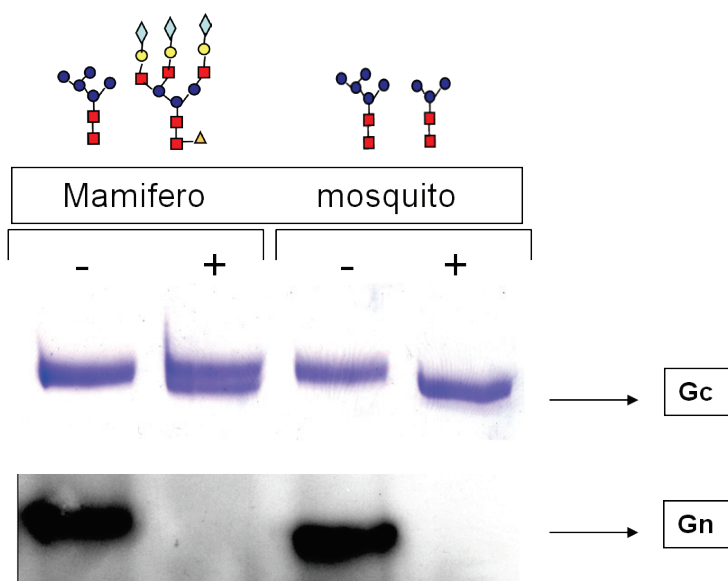
frecuente observar una estructura cilíndrica adyacente a los virus liberados por células C6/36 que podría indicar la existencia de un punto débil en la estructura del virión.

Utilizamos la técnica de réplica metálica (o sombreado metálico), y posterior visualización por TEM, ya que es muy útil cuando se quiere estudiar la estructura viral en superficie. En este caso, realizamos el sombreado con Tántalo de VE purificados de células C6/36 y BHK-21. Por estudios previos del grupo (Novoa y cols., 2005 b) se sabe que los VE producidos por células de mamífero muestran una ordenación estructurada de las glicoproteínas de la envuelta viral, mientras que las formas virales inmaduras intracelulares exhiben una superficie lisa y la ordenación de las espículas no es visible (figura 32). En consonancia con los estudios bioquímicos y de TN, los VE purificados de células de mosquito eran redondeados y lisos en la superficie, siendo mucho más similares a los virus intracelulares tipo I que a los VE de células de mamífero. Sin embargo, la infectividad de VE generados en células C6/36 es muy similar a la infectividad de VE generados en células BHK-21 o Vero.

En las purificaciones de virus producidos por células de mosquito, se producía además la co-purificación de unas estructuras filamentosas (figura 33). La secuenciación por espectrometría de masas MALDI-TOFF de la banda adicional en PAGE-SDS que aparecía en las fracciones ricas en virus en donde estaban estas estructuras filamentosas arrojó una similaridad (aunque no significativa), con una proteína tipo actina de *Strongylocentrotus purpuratus* (erizo de mar).

Figura 31. Digestión de Gc y Gn con Endo H.

Gc de VE producidos por células de mamífero es parcialmente resistente a Endo H; produce dos bandas, la superior de azúcares complejos y la de menor peso molecular de azúcares inmaduros o de alto contenido en manosa. Gc de VE producidos por células de mosquito es totalmente sensible y sus azúcares son por tanto de tipo inmaduro. Gn de VE producidos por células de mamífero tiene un mayor peso molecular que Gn de VE producidos por células de mosquito, probablemente por la diferente composición de sus glicanos. No se pudo evaluar la resistencia a PGNasaF debido a que con la digestión con la enzima Gn se degradaba. En los esquemas de las ramas de glicanos se representan residuos de N-acetilglucosamina (cuadrados rojos), manosa (círculos azules), glucosa (círculos amarillos), fucosa (triángulos amarillos) y N-acetilneuraminidasa (rombos azules).



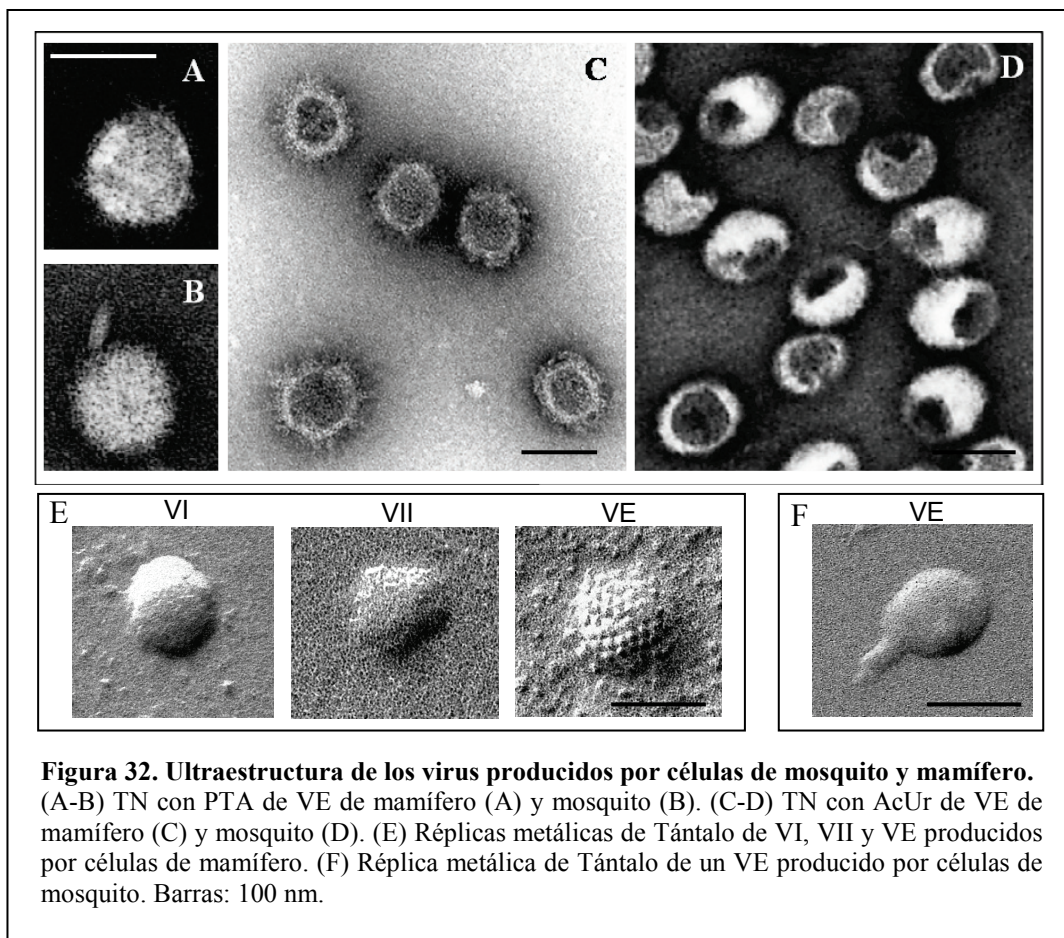


Figura 32. Ultraestructura de los virus producidos por células de mosquito y mamífero. (A-B) TN con PTA de VE de mamífero (A) y mosquito (B). (C-D) TN con AcUr de VE de mamífero (C) y mosquito (D). (E) Réplicas metálicas de Tántalo de VI, VII y VE producidos por células de mamífero. (F) Réplica metálica de Tántalo de un VE producido por células de mosquito. Barras: 100 nm.

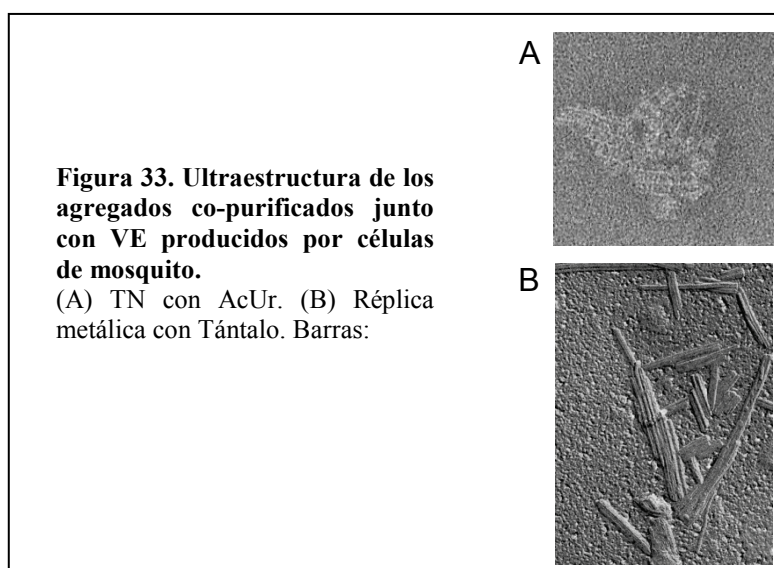


Figura 33. Ultraestructura de los agregados co-purificados junto con VE producidos por células de mosquito. (A) TN con AcUr. (B) Réplica metálica con Tántalo. Barras:

7. **Estudio de mutantes del BUNV que contienen una delección parcial en la proteína NSm. Infección en células de mamífero.**

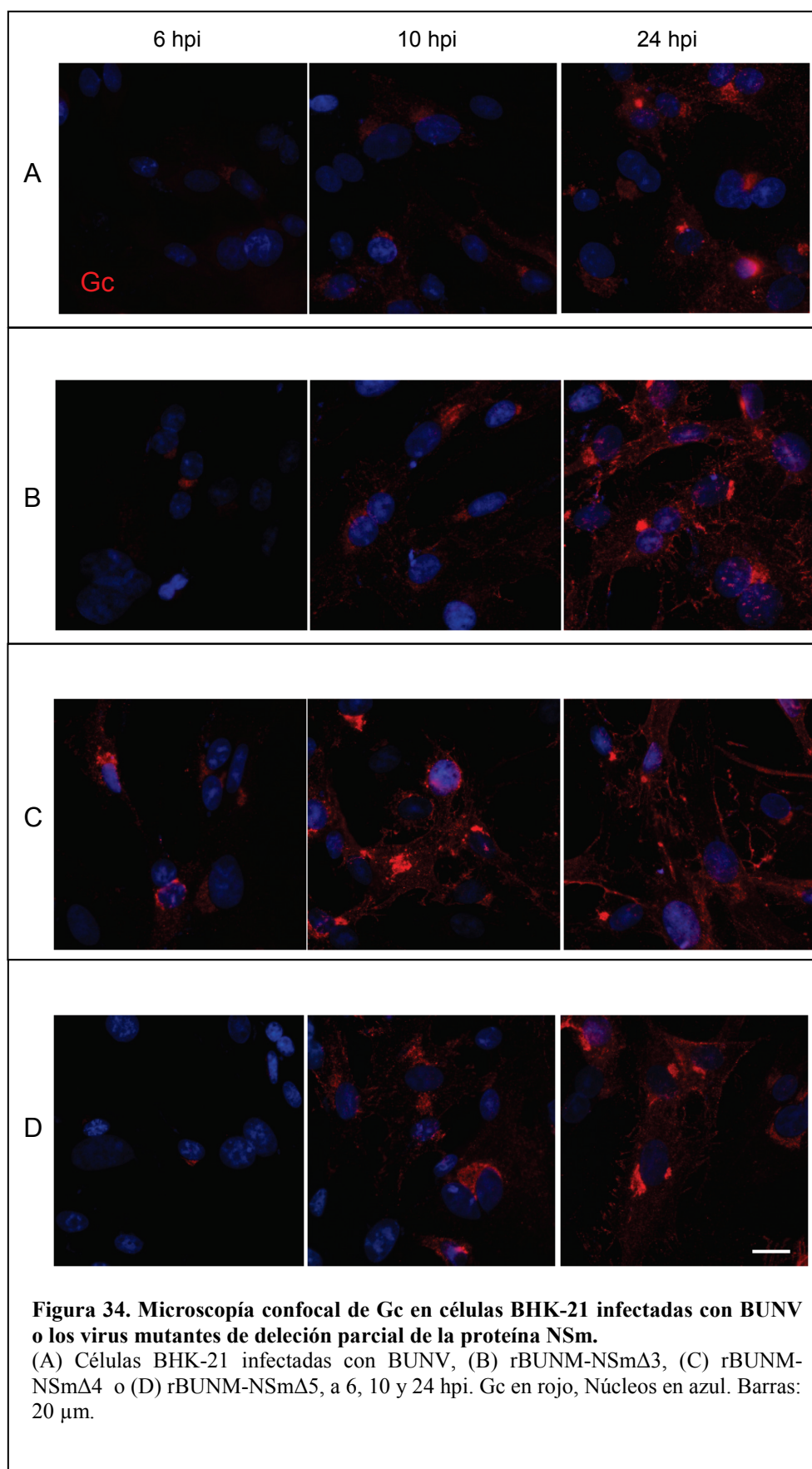
Para estudiar las funciones de la proteína no estructural NSm se utilizaron tres virus BUNV recombinantes que contienen delecciones parciales en la secuencia de esta proteína (descritos en material y métodos): rBUNM-NSm Δ 3, rBUNM-NSm Δ 4 y rBUNM-NSm Δ 5. Se estudió la infección con los virus recombinantes y el BUNV original a 6, 10 y 24 hpi en células BHK-21.

En células infectadas con BUNV “wild type”, NSm co-localiza con Gc y ambas se localizan en el aparato de Golgi, además no se observa acumulación de NSm en el RER.

Mediante microscopía confocal se vio que en dos de los mutantes de delección, rBUNM-NSm Δ 3 y rBUNM-NSm Δ 4, la glicoproteína Gc se detectaba antes, y con una señal más intensa que en la infección con el BUNV original. Además, se observó que Gc no sólo se acumulaba en el aparato de Golgi, sino también en la membrana plasmática, de forma que dibujaba el contorno celular. El mutante rBUNM-NSm Δ 5 tenía un comportamiento similar al BUNV original, aunque también se producía una ligera relocalización de Gc en la membrana plasmática (figura 34).

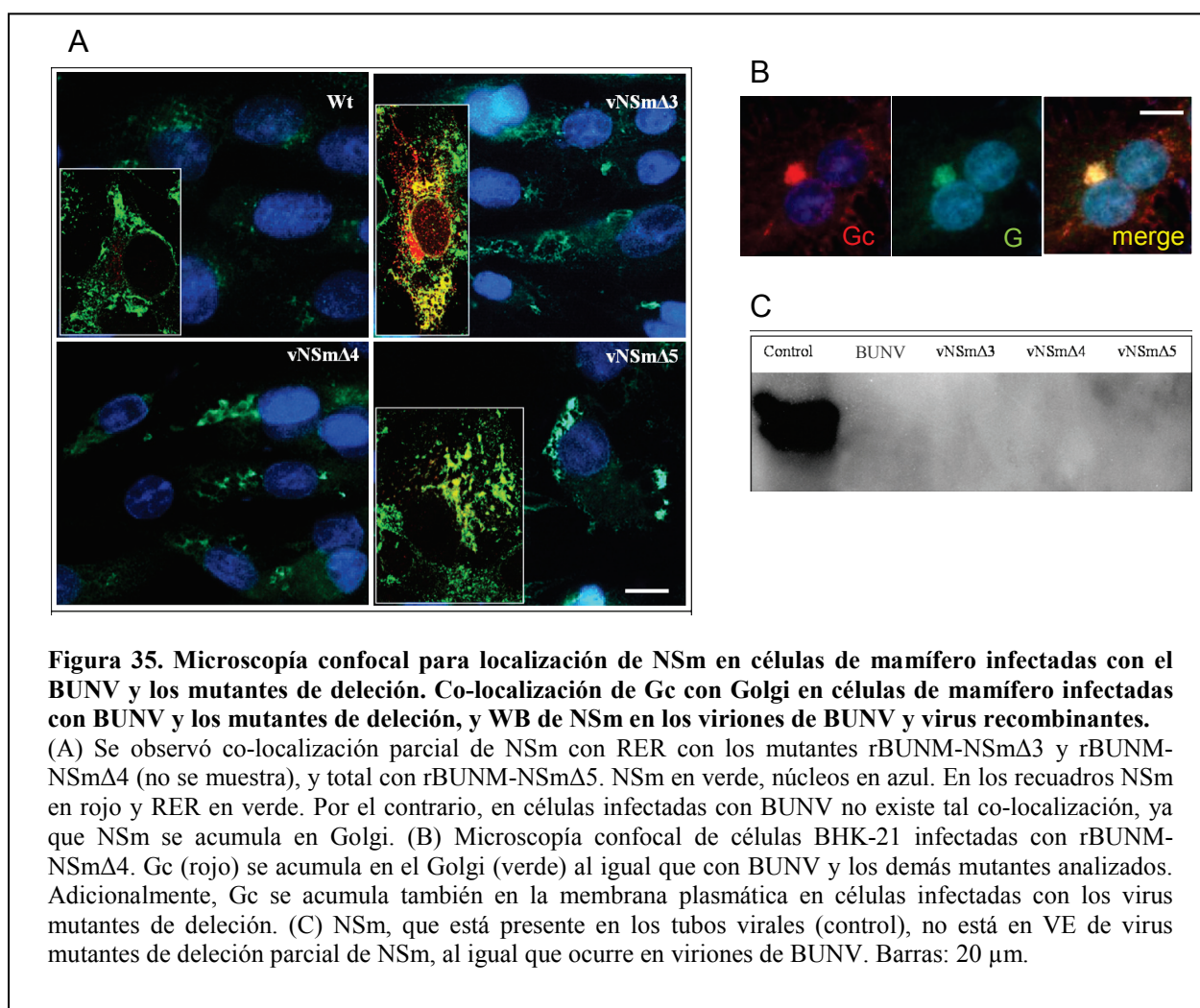
El porcentaje de infección en células BHK-21, medido como porcentaje de células con marcaje positivo de anti-BUN, era similar en rBUNM-NSm Δ 5 y BUNV. En rBUNM-NSm Δ 3 y rBUNM-NSm Δ 4 la infección progresa a más velocidad. En todos ellos, al cabo de 24 hpi el porcentaje de infección es del 100%.

Para averiguar la localización de las diferentes NSm delecionadas se realizaron estudios de IFA con anticuerpos anti-NSm y se observó que tanto NSm Δ 3, como NSm Δ 4 y NSm Δ 5 tenían patrones de distribución de tipo reticular, a diferencia de la NSm original que, al co-localizar con el aparato de Golgi, tiene un patrón perinuclear en forma de media luna. Esta distribución reticular era muy similar a la que presenta el RER. Como supusimos, existía una co-localización parcial de NSm Δ 3 y NSm Δ 4 con anti-PDI (marcador del RER). Es decir, aunque la mayoría de las proteínas se localizaban en el aparato de Golgi, un porcentaje se retenía en RER. En el caso de NSm Δ 5, la co-localización con anti-PDI era total. Al igual que ocurría con Gc, hay un marcaje más intenso de las proteínas NSm Δ 3 y NSm Δ 4 que de la proteína NSm original (figura 35).



Se sabe que la proteína NSm está presente en las partículas virales inmaduras pero que no forma parte de los virus extracelulares. Para evaluar si por algún defecto de procesamiento las NSm delecionadas formaban parte de los viriones mutantes, se analizaron mediante WB de los sobrenadantes de cultivos infectados con los distintos virus. Como control positivo se utilizaron tubos virales purificados (complejos replicativos) de células BHK-21, que se sabe contienen NSm (Fontana y cols., 2008). De igual forma que en el BUNV original, las diferentes NSm delecionadas no se detectaron en los viriones mutantes en ningún caso (figura 35).

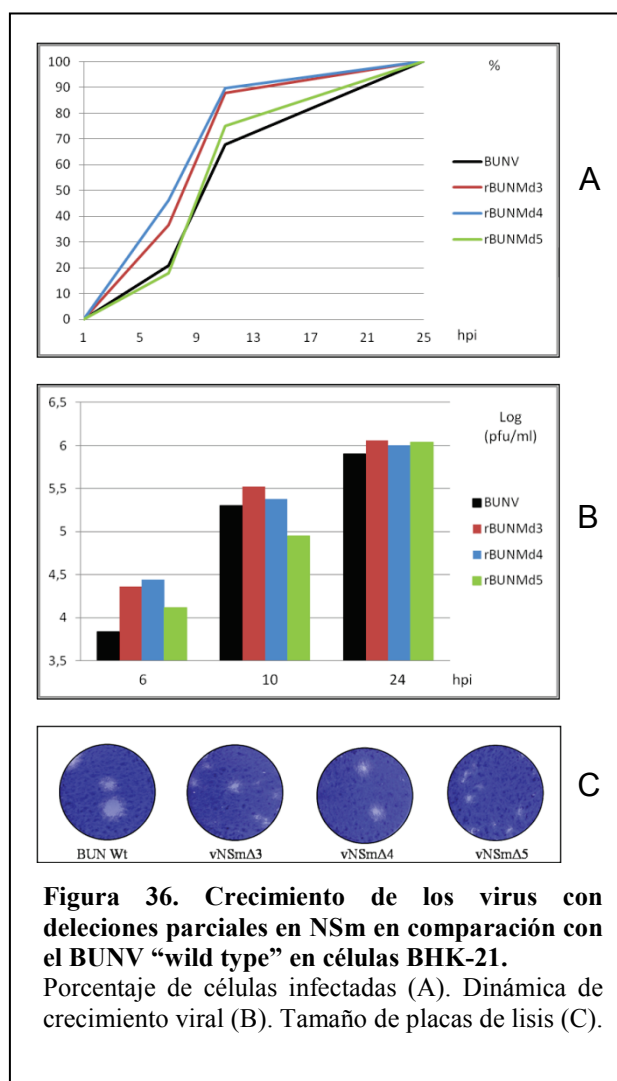
Realizamos titulaciones de virus infectivos liberados al sobrenadante a los mismos tiempos post-infección que los experimentos de IFA. La liberación de partículas infectivas era similar, incluso ligeramente superior a la liberación de partículas de BUNV original en células BHK-21. Sin embargo, las placas de lisis eran ligeramente más pequeñas que las producidas por el BUNV original



Se analizaron mediante TEM de cortes orientados, células infectadas con los virus mutantes a los distintos tiempos post-infección (6, 10 y 24 hpi) (figura 37). Las principales diferencias que observamos, con respecto a la ruta morfológica del BUNV “wild type”, es la ausencia de tubos virales largos en la zona de la factoría viral.

Otra diferencia fue la acumulación de virus intracelulares en la factoría viral en los mutantes rBUNM-NSm Δ 3 y rBUNM-NSm Δ 4. Además, en la infección con todos los mutantes, sobre todo con el rBUNM-NSm Δ 5, es frecuente observar RER dilatados o colapsados (figura 37).

Por último, vimos fenómenos de gemación en membrana plasmática e incluso viriones aparentemente vacíos en el espacio extracelular (figura 37).



8. Estudio de mutantes del BUNV que contienen una deleción parcial en la proteína NSm. Infección en células de mosquito.

Para establecer la comparación con los estudios realizados en células de mamífero, realizamos unos experimentos previos con los tres virus recombinantes que tienen una deleción parcial en la proteína NSm.

Se estudió mediante IFA la localización de la proteína Gc en células C6/36 infectadas a 24 y 48 hpi con los virus recombinantes y el BUNV original. Al igual que ocurría en células de mamífero BHK-21, en la infección con rBUNM-NSm Δ 3 y rBUNM-NSm Δ 4, la glicoproteína Gc se detectaba antes y con una señal más intensa, que en la infección con el BUNV original. Además, los compartimentos en donde se acumulaba la proteína Gc tenían un mayor tamaño. En la infección con el mutante rBUNM-NSm Δ 5 había un menor porcentaje de células con marcaje positivo y la intensidad de la señal era menor.

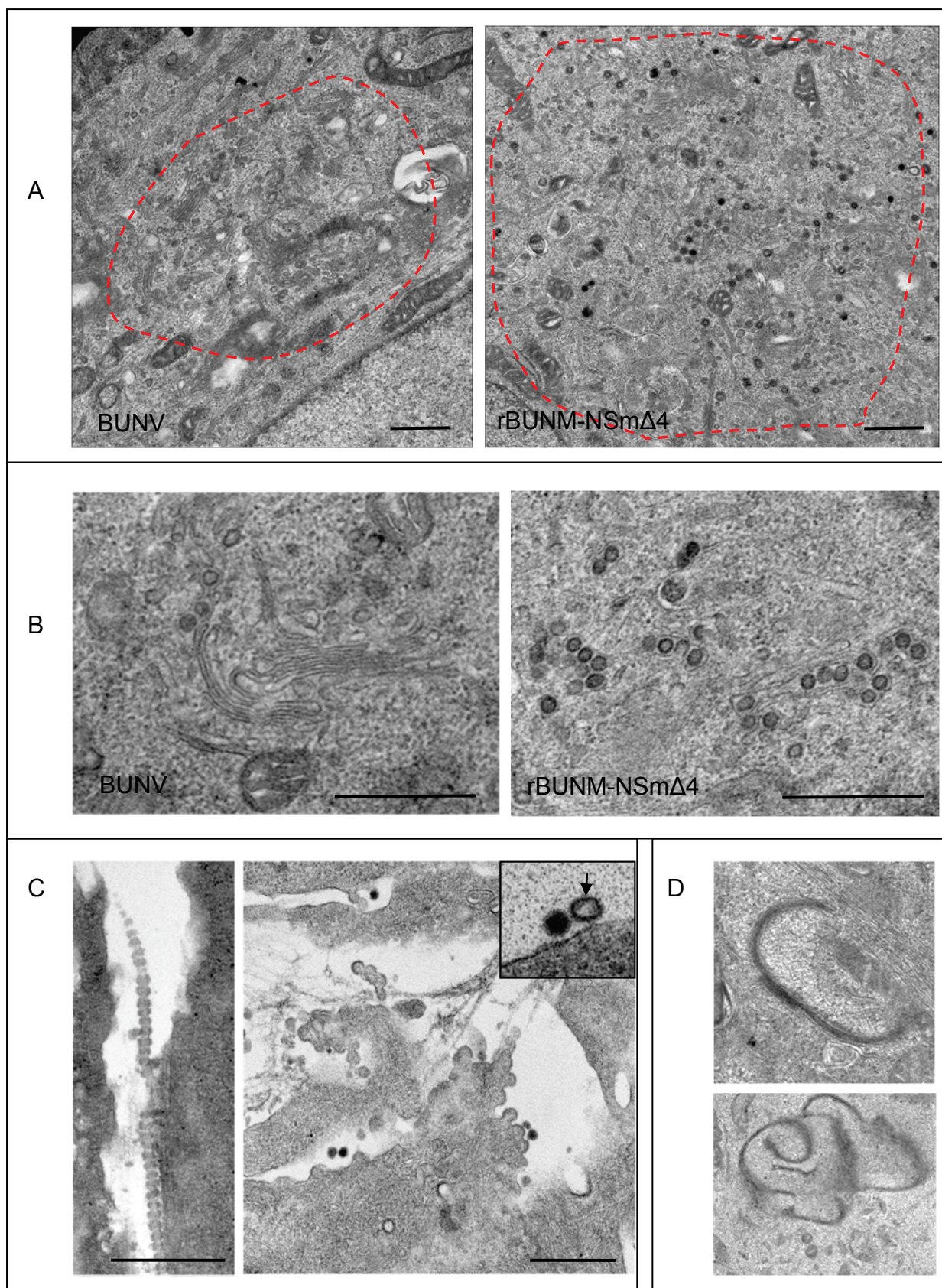


Figura 37. Microscopía electrónica de células de mamífero infectadas con BUNV "wild type" y virus mutantes de delección parcial de la proteína NSm.

(A) Las factorías virales (enmarcadas con líneas discontinuas) del rBUNM-NSm Δ 3 y rBUNM-NSm Δ 4 contienen a tiempos tempranos (6 hpi) más cantidad de partículas virales que las factorías del BUNV “wild type”. (B) Detalle a mayor magnificación de las factorías virales. (C) Los virus mutantes de delección de NSm provocan fenómenos de “budding” en las membranas plasmáticas de las células que infectan. En el recuadro se puede observar un ejemplo de partícula viral aparentemente vacía (flecha) en el espacio extracelular al lado de un VE de apariencia normal. (D) En células de mamífero infectadas con rBUNM-NSm5 se produce el colapso del RER probablemente debido a una acumulación de la NSm deletcionada. Barras: 1 μ m,

Para los estudios detallados escogimos el mutante rBUNM-NSm Δ 4, ya que presenta el mismo fenotipo que el rBUNM-NSm Δ 3 pero con un mayor tamaño de los compartimentos en donde se acumula Gc, el aparato de Golgi. Descartamos el rBUNM-NSm Δ 5 para estudios posteriores ya que, por los experimentos en células de mamífero, vimos que la NSm Δ 5 no se retenía en Golgi y no producía en células infectadas un fenotipo muy diferente del fenotipo del BUNV “wild type”.

Se realizaron infecciones con rBUNM-NSm Δ 4 y el BUNV original a 8, 15, 25, 50, 75, 100 y 125 hpi. A cada tiempo post-infección se realizaron IFA y microscopía confocal para localizar Gc y NC. La dinámica de ambas proteínas era igual en ambos virus, pero en la infección con rBUNM-NSm Δ 4 se vio que de los compartimentos en donde se acumula la proteína Gc, el aparato de Golgi, estaban más dilatados (figura 38).

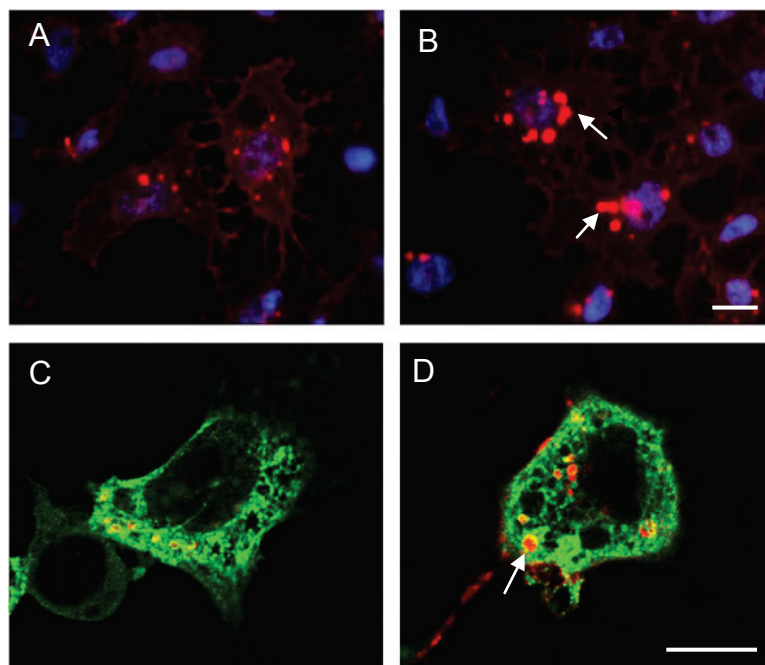


Figura 38. Dilatación de los compartimentos de ensamblaje en células de mosquito infectadas con rBUNM-NSm Δ 4.

(A) y (B) Microscopía de epifluorescencia de células infectadas con BUNV (A) y rBUNM-NSm Δ 4 (B) a 15 hpi. (C) y (D) Plano individual de imagen de microscopía confocal de Gc (rojo) y NC (verde). Las flechas indican los compartimentos de Golgi más dilatados en células infectadas con el virus recombinante. Barras: 20 μ m.

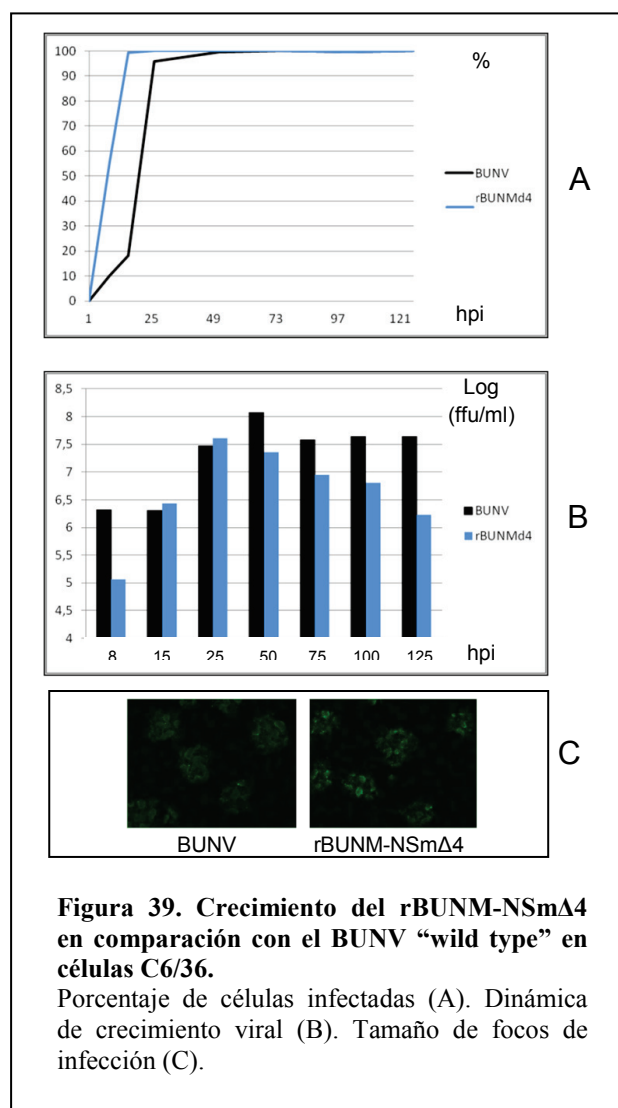
Se realizaron recuentos del número de células con marca de anti-BUN y se vio que, aunque tanto el BUNV original como rBUNM-NSm Δ 4 llegaban a infectar el 100% de las células, la infección con el virus recombinante avanzaba más rápidamente sobre todo en etapas tempranas (figura 39).

Realizamos titulaciones de sobrenadantes de las monocapas celulares infectadas con los distintos virus para cuantificar los niveles de virus infectivos liberados a los mismos tiempos de post-infección que los experimentos de IFA. El título máximo fue muy similar para ambos virus, aunque se alcanzó antes en el caso del virus recombinante. Tras llegar al valor máximo, se produjo una mayor disminución del título alcanzado en los sobrenadantes de células infectadas con el virus recombinante que en los de células infectadas con el virus original. Esto podría indicar una mayor labilidad de los virus recombinantes frente a la acidificación del medio de cultivo. El tamaño de placa fluorescente fue similar en ambos casos (figura 39).

Para completar el estudio se analizaron mediante TEM de cortes orientados las células C6/36 infectadas con los virus mutantes a los distintos tiempos de post-infección ya mencionados. La principal diferencia que se detectó fue un aumento moderado de la cantidad de virus intracelulares asociados a las mini factorías virales (figura 40).

Ya que el anticuerpo específico para NSm no funcionó en células C6/36, no pudimos realizar los estudios de localización intracelular de la proteína mediante IFA; tampoco fue posible localizar NSm en los viriones mediante WB, como se había hecho previamente en células BHK-21.

Estos datos apuntan a una posible función de regulación negativa de la infección por la proteína NSm. Este punto de desarrollará en discusión.



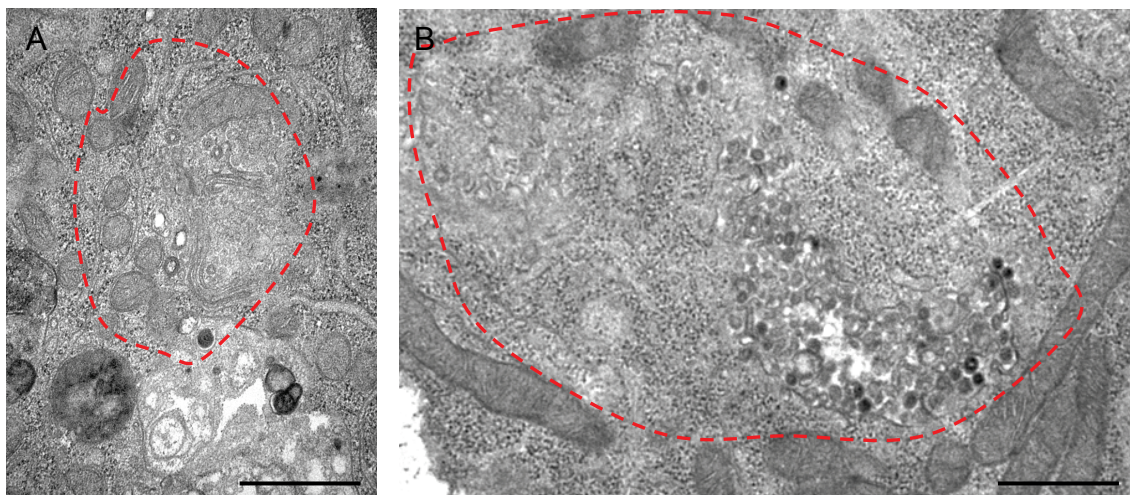


Figura 40. TEM de las factorías virales de BUNV (A) y rBUNM-NSmΔ4 (B) en células de mosquito C6/36. Las mini-factorías tienen mayor tamaño y mayor cantidad de virus en las células de mosquito infectadas con el virus mutante que con el “wild type”. Barras: 1 μ m.

9. Generación de virus recombinantes con “tag” de MT.

Dado que con las técnicas convencionales de microscopía electrónica no se pudieron identificar las estructuras que contienen los complejos replicativos del BUNV en células de mosquito, desarrollamos con tal fin una herramienta nueva de mapeo molecular.

Como hemos descrito en la introducción, en el punto dedicado a la localización y estudio de macromoléculas en las células, el método METTEM permite combinar la localización específica y de alta sensibilidad de moléculas en las células, con los últimos avances en métodos de crio-microscopía electrónica, que consiguen una alta preservación de la ultraestructura celular.

Para poner a punto esta metodología en nuestro sistema de estudio, el BUNV, y obtener una herramienta que nos permitiera estudiar los complejos replicativos y sitios de ensamblaje del virus en las células con alta resolución, intentamos la inserción del “tag” de MT en una proteína viral clave para la replicación (la polimerasa viral, L) y una que interviene en el ensamblaje (la proteína no estructural NSm).

Tal y como hemos descrito en introducción, los complejos replicativos del BUNV en células de mamífero se ensamblan en una estructura globular o “esférula” unida a una estructura tubular (Fontana y cols., 2008). El estudio *in vivo* de estas estructuras, en donde se encuentran las proteínas virales L y NSm, podría generar información detallada sobre las interacciones entre elementos virales y celulares que se producen en las células infectadas.

Para establecer las condiciones óptimas de visualización de los “nano-clusters” que se forman al unirse los átomos de oro a la proteína MT, se planteó la inserción de una o dos secuencias de MT en tándem. En nuestro laboratorio se había comprobado que una sola MT es suficiente para la formación de nano-partículas visibles en secciones ultrafinas de bacterias y células de mamífero (Diestra y cols., 2009 a y b; Risco y cols., 2012).

Se decidió la inserción de una secuencia de MT en dos sitios específicos alternativos de la polimerasa viral, el L4 o el L5, utilizados previamente por el grupo del Prof. Richard Elliott para la inserción con éxito, en dicha polimerasa, del “tag” inmunoreactivo V5 (Shi y Elliot, 2009). En el caso de NSm, se planeó insertar 2 MT en tándem en el mismo lugar de la secuencia en el que el grupo del Prof. Richard Elliott había conseguido la inserción de la secuencia de EGFP (Shi y cols., 2006). De esta forma, se tenía la ventaja de saber que esos sitios en las proteínas virales L y NSm eran permisivos para la inserción de secuencias heterólogas.

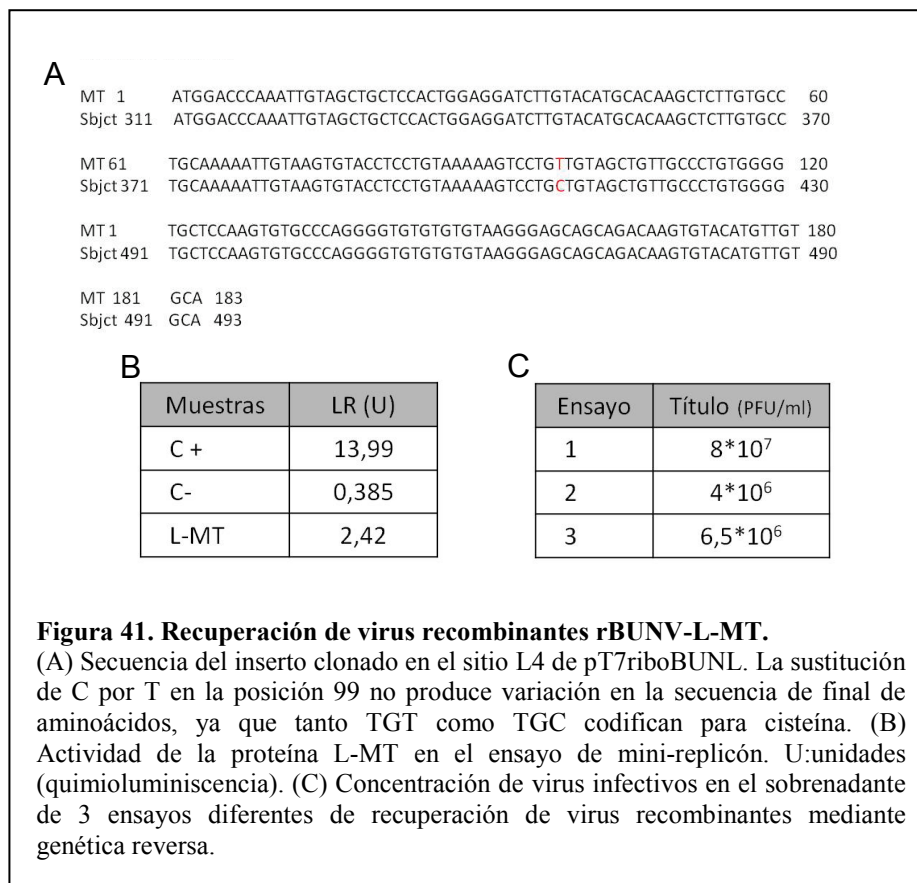
Tras varios intentos de clonaje, como está descrito en material y métodos, sólo se consiguieron bacterias competentes transformadas con el plásmido pT7riboBUNL4-MT. Se corroboró mediante secuenciación del pT7riboBUNL4-MT que la secuencia de aminoácidos correspondiente al inserto clonado era igual que la secuencia de la MT “wild type” (figura 41). No fue posible conseguir la inserción de 1 MT en el sitio L5 del plásmido pT7riboBUNL ni de 2 MT en pT7riboBUNM-NSm.

Una vez que obtenido el plásmido pT7riboBUNL4-MT, realizamos un ensayo de quimioluminiscencia en un sistema de mini-replicón, como se describe en material y métodos, para evaluar la actividad replicasa de la polimerasa recombinante L-MT. Esta fue menor que la de la polimerasa viral original, concretamente un 17,3% de la actividad en comparación con la polimerasa “wild type” pero similar a la actividad de la polimerasa L-V5 (Shi y Elliott, 2009). La proteína L-MT presentaba actividad positiva en comparación con el control negativo (figura 41).

Una vez comprobada la actividad replicasa positiva de L-MT, pasamos a la generación de partículas virales recombinantes. Para ello se co-transfectaron células BSR-T7/5 (descritas en material y métodos) con los tres plásmidos correspondientes a los cDNAs de los tres segmentos del genoma viral (L, M y S), siendo el correspondiente al segmento genómico L el recombinante L-MT.

En el interior de las células co-transfectadas, los plásmidos se transcriben para dar lugar al RNA correspondiente a los tres segmentos genómicos. En estas condiciones se imita la infección natural y se generarán virus recombinantes con L-MT. Como control positivo se utilizaron los plásmidos análogos correspondientes a las secuencias del BUNV original. La técnica de generación de virus recombinantes se llevó a cabo en el

laboratorio del Prof. Richard Elliott, grupo que realizó por primera vez la generación de virus recombinantes de genoma RNA segmentado sin ayuda de sistemas virales auxiliares (Bridgen y Elliott, 1996).



Tras las co-transfecciones, se dejaron las células incubando durante 4 y 9 días para permitir el ensamblaje y liberación de los virus recombinantes. Tras ello, se realizaron las titulaciones de los sobrenadantes. En 3 ensayos diferentes se obtuvieron virus recombinantes infectivos, que denominamos rBUNV-L-MT (figura 41).

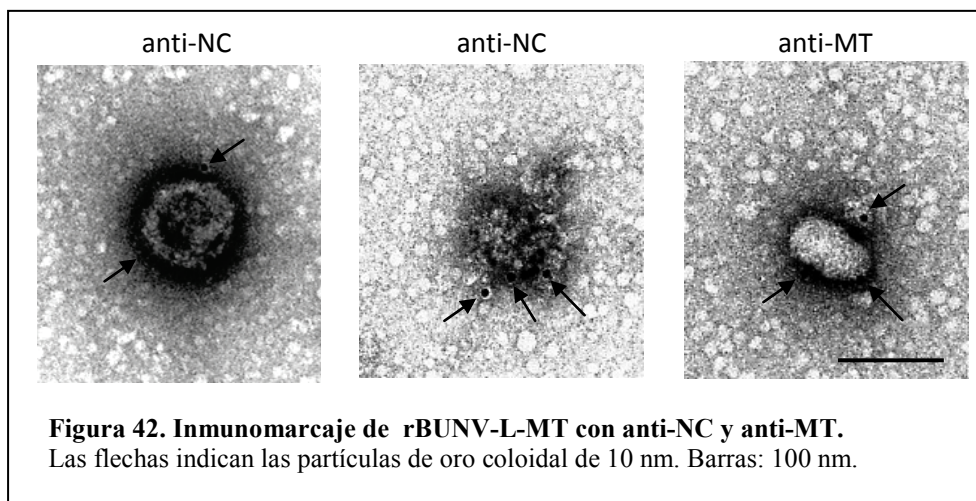
10. Optimización previa de condiciones para el estudio de BUNV-L-MT *in vitro*.

Estos estudios se llevaron a cabo para la identificación de viriones en los sobrenadantes de los experimentos de generación de virus recombinantes mediante genética reversa. También para comparar la estructura de estos virus recombinantes con la de los virus BUNV originales.

Se realizaron inmunomarcajes con anti-NC y anti-MT en partículas virales de rBUNV-L-MT o BUNV sometidas previamente a 10 ciclos de congelación-descongelación, para provocar la ruptura controlada de los viriones y consiguiente

liberación de las RNPs, en donde se localiza la polimerasa viral. El rBUNV-L-MT fue más sensible a los procesos de ruptura controlada que el BUNV original.

En las partículas virales abiertas se detectó marcaje con anti-NC tanto en BUNV como en rBUNV-L-MT. Con anti-MT el marcaje fue débil en las partículas de rBUNV-L-MT (figura 42) y totalmente ausente en los viriones BUNV.



11. Optimización previa de condiciones para el estudio de BUNV-L-MT *in vivo*.

El objetivo final de la obtención de virus recombinantes portadores del “tag” de MT, que con los tratamientos con sales de oro se vuelve denso a los electrones, es el estudio de las proteínas virales en células infectadas mediante técnicas de TEM. Previo a los estudios con los virus recombinantes, es necesaria la optimización de las condiciones de incubación de células con sales de oro y de los procesamientos de visualización de las muestras tratadas mediante técnicas de TEM.

El sistema de estudio elegido para la puesta a punto del protocolo fue el de células de mamífero (BHK-21), ya que en ellas la estructura de los orgánulos de replicación está bien definida (Fontana y cols., 2008), mientras que en células de mosquito no han sido todavía identificados.

Se probaron diferentes tratamientos (figura 43). Las diferentes sales de oro se eligieron en función de los estudios y datos previos ya disponibles (Mercogliano y DeRosier, 2006 y 2007; Diestra y cols., 2009 a y b; Risco y cols., 2012) y los tiempos elegidos fueron aquellos tiempos máximos de incubación en los que no se observaron efectos en la viabilidad celular. Los tiempos de incubación con cloruro auroso fueron

menores porque mientras que este entra al interior celular mediante difusión pasiva, el aurotiomalato lo hace por transporte activo.

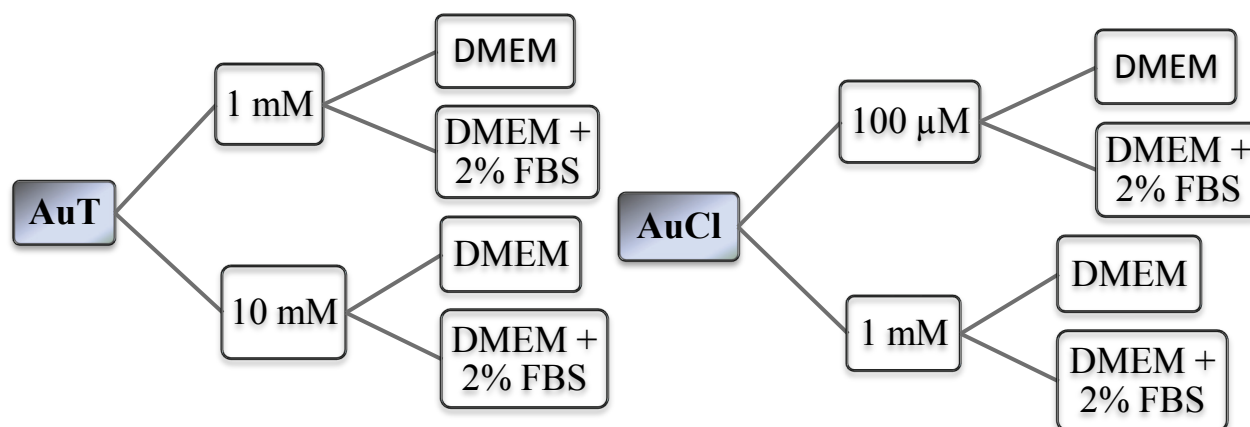


Figura 43. Esquema de los distintos tratamientos con sales de oro.

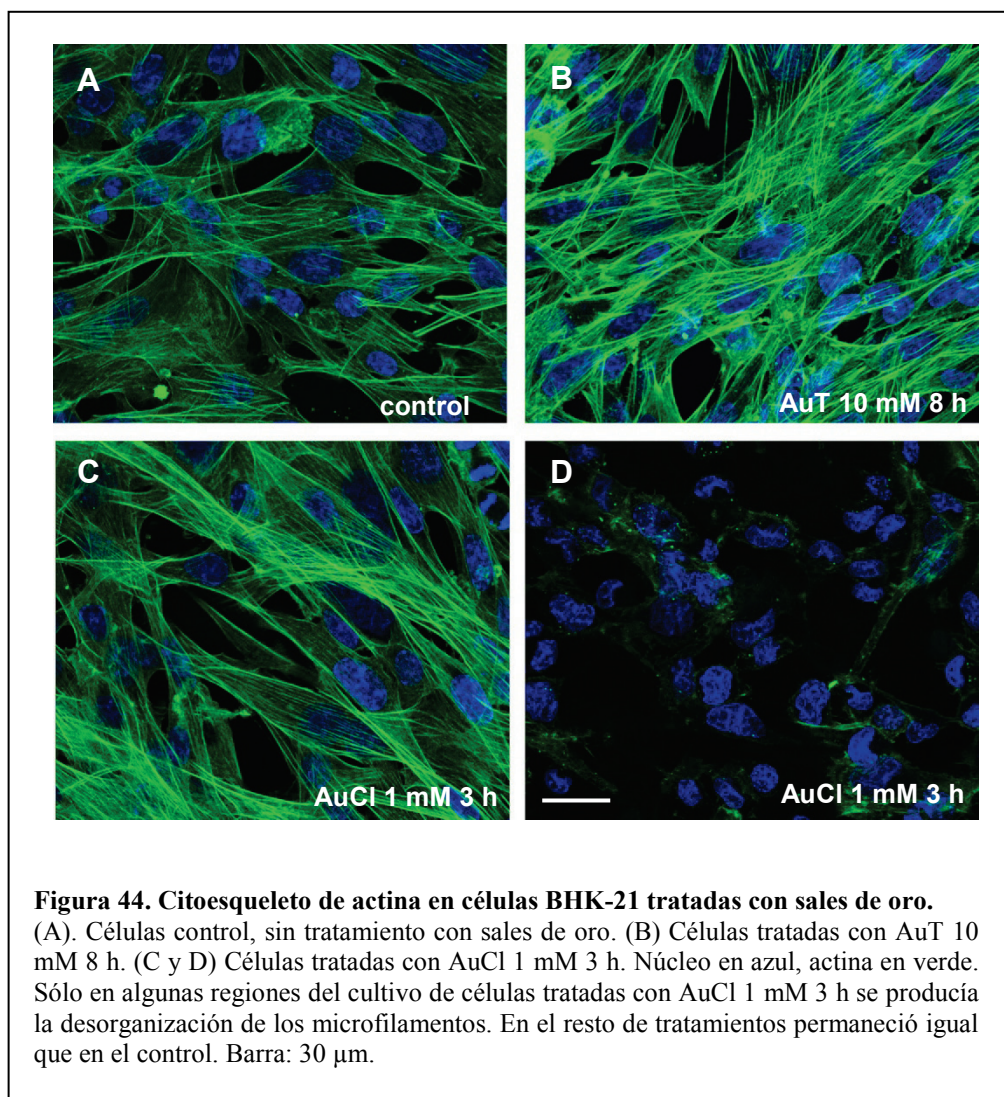
Para comprobar que las células mantenían su integridad tras los diferentes tratamientos, se realizó microscopía confocal con la sonda fluorescente faloidina para visualizar el citoesqueleto de actina. No se observaron diferencias en el citoesqueleto al comparar con células control, excepto en células tratadas con la concentración mayor de AuCl. En este caso, la mayoría de células exhibían un aspecto normal pero existían algunos focos en el cultivo, en donde las células tenían los microfilamentos desorganizados (figura 44). El análisis de la ultraestructura celular mostró células sin alteraciones en todos los tratamientos.

Las incubaciones con las distintas sales de oro se hicieron con medio de cultivo suplementado o no con FBS, ya que al contener el FBS una gran variedad de proteínas que podrían tener regiones ricas en cisteína, incluyendo la proteína MT (Hidalgo y cols., 1994), podría interactuar con las sales de oro y causar artefactos.

Adicionalmente, había que tener en cuenta el hecho de que las células eucariotas tienen un sistema de detoxificación basado en MT (Chan y cols., 2002) con lo que, al contrario que en bacterias, tienen una expresión endógena de MT, hecho que comprobamos mediante WB. Por ello, era necesario averiguar si esta MT endógena era suficiente para acomplejar los átomos de metal de las sales de oro dando un fondo de señal inespecífica.

Para conseguir una alta resolución en el análisis de las proteínas MT, que nos permitiese obtener mapas de resolución molecular, establecimos un protocolo de procesamiento de las células tratadas con sales de oro que procurase una alta

preservación de la ultraestructura celular. Este protocolo, descrito en material y métodos, constó de la vitrificación, y posterior criosustitución en metanol o metanol + 0'25% AcUr, de las células tratadas crecidas en monocapa. La inclusión se llevó a cabo en resina Lowycril® HM23, idónea por su alta transparencia a los electrones y capacidad para realizar inmunomarcajes.



Tras este protocolo se recogieron secciones ultra-finas en rejillas con soporte quantifoil/carbón y se visualizaron bajo el ME. En ninguna de las muestras observaron cristales de hielo, indicativos de una vitrificación deficiente, y la morfología celular era normal. En células sustituidas en metanol, sin AcUr, era posible distinguir el núcleo y compartimentos intracelulares (figura 45). El contraste no mejoró significativamente si se añadía AcUr al medio de sustitución.

En ninguna de las muestras incubadas con sales de oro disueltas en DMEM se visualizaron partículas densas a los electrones, que pudieran indicar un fondo inespecífico provocado por la MT endógena. Sin embargo, en las muestras tratadas con

sales de oro disueltas en medio de cultivo suplementado con FBS se visualizaron con frecuencia “clusters” electrón-densos en compartimentos intracelulares compatibles con estructuras endosomales (figura 45).

Tras el análisis previo de estos factores se llegó a la conclusión de que, para una correcta interpretación de los experimentos futuros con los virus recombinantes rBUNV-L-MT, las muestras se tratarán con AuT (1 y 10 mM) y AuCl (100 μ M y 1 mM) disueltas en medio de cultivo sin FBS durante un máximo de 1 h como seguridad para evitar efectos debidos a la toxicidad del oro y se procesarán mediante vitrificación y criosustitución en metanol, y posterior inclusión en resina Lowycril[®] HM23.

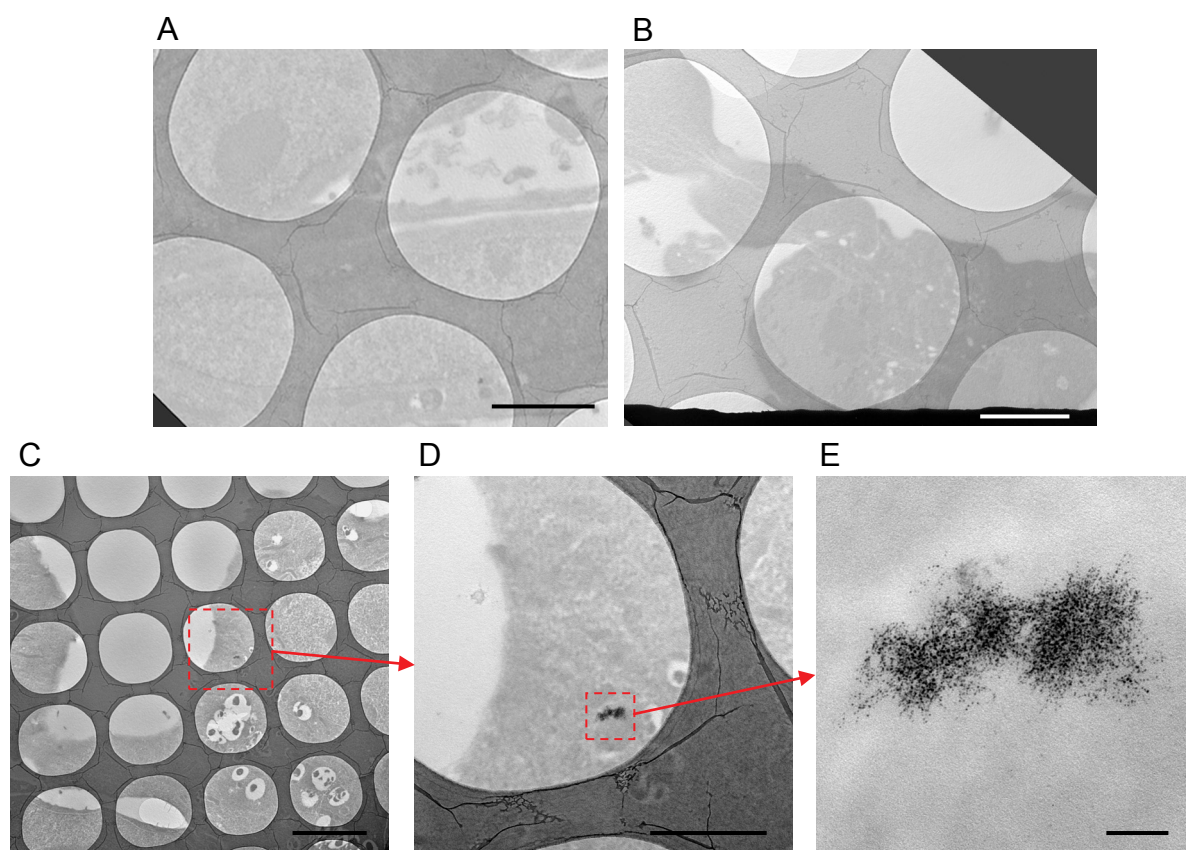


Figura 45. TEM de células BHK-21 vitrificadas, crio-sustituidas en metanol e incluidas en resina.

(A) Células tratadas con AuT 10 mM 8 h sin FBS. (B) Células tratadas con AuCl 1 mM 3 h sin FBS. En (A) y (B) las células tienen una morfología normal y un contraste suficiente para distinguir los compartimentos intracelulares. En ningún caso se observaron partículas electrón-densas. (C) Micrografía a baja magnificación de células tratadas con AuT 10 mM 8 h y FBS. (D) Zoom de la región señalada en (C), se puede observar una zona densa en el interior de un compartimento intracelular. (E) Zoom de la región señalada en (D), se pueden distinguir claramente los “nano-clusters” densos provocados por el FBS. Estos “nano-clusters” se encontraban en todos los tratamientos con sales de oro que incluían FBS. Barras: 2 μ m en A, B y D, 5 μ m en C, 100 nm en E.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo hemos estudiado varios aspectos de la biología del BUNV:

Hemos observado cómo las células de mosquito infectadas sufren transformaciones estructurales dramáticas asociadas a la fase aguda previa a la entrada en persistencia, hecho que hasta ahora se desconocía. Hemos analizado los posibles motivos por los que las células de mosquito sobreviven a la infección, mientras que las células de mamífero mueren rápidamente. Hemos analizado las posibles funciones de la proteína viral no estructural NSm, tanto en células de mamífero como en células de mosquito; y finalmente, hemos generado un virus portador de un “tag” clonable válido para TEM basado en la proteína MT fusionado a la polimerasa viral, y hemos puesto a punto el protocolo para el futuro estudio de los orgánulos de replicación del virus mediante el método METTEM.

A continuación, discutimos en detalle cada uno de estos aspectos agrupando, para una mejor comprensión, los diferentes temas en tres apartados:

1. Dinámica de la infección por BUNV en células de mosquito C6/36.
2. Posibles funciones de la proteína viral NSm.
3. Generación de BUNV recombinante con un “tag” de MT y puesta a punto del protocolo para su estudio en células mediante METTEM.

1. Dinámica de la infección por BUNV en células de mosquito C6/36.

Cuando un virus infecta una célula, los pasos subsecuentes en su ciclo de replicación implican interacciones entre diferentes tipos de componentes virales y un conjunto mucho más complejo de factores del hospedador (Novoa y cols., 2005 a; Netherton y cols., 2007; de Castro y cols., 2012).

En el caso de los arbovirus, la identificación de interacciones que llevan a la lisis en células de mamífero y a la persistencia y supervivencia en células de mosquito será de gran importancia, no sólo para entender las bases de la citopatogenicidad de los arbovirus sino también para identificar nuevas formas para interferir con el daño celular y muerte causada por los virus patógenos de genoma RNA. En la actualidad, estamos justo empezando a entender la alta complejidad de las interacciones entre arbovirus y sus vectores artrópodos (Fragkoudis y cols., 2009; Vasilakis y cols., 2009).

Nuestros resultados con el BUNV en células de mosquito pueden contribuir a entender como estas células son capaces de mantener la infección bajo control.

El hecho de que el BUNV establece infecciones de tipo persistente en células del vector artrópodo era conocido (Elliott y Wilkie, 1986). Además, en los organismos

completos la infección es de por vida afectando incluso a los huevos, sin generar efectos deletéreos o síntomas aparentes (Borucki y cols., 2002; Reese y cols., 2009). Sin embargo, hasta la fecha se desconocía cómo el virus establecía esta infección persistente y se daba por hecho que alcanzaba este equilibrio desde el principio de la infección.

En esta tesis hemos analizado los tiempos más tempranos en el curso de la infección, hemos descubierto cómo en células de mosquito C6/36 la infección pasa primero por una fase aguda, característica y distinguible, previa al establecimiento de la persistencia. Con posterioridad, la existencia de las tres fases definidas en esta tesis (temprana, aguda y de persistencia) fue corroborada también en otras dos líneas celulares de *Ae.albopictus*, U4.4 y C7/10 (Szemiel y cols., 2012).

Se pueden establecer tres fenómenos característicos que definen la entrada en persistencia: coalescencia de los “N-bodies” formados en la fase aguda, desaparición de las prolongaciones formadas también durante la fase aguda y un bloqueo de la liberación de virus al sobrenadante.

Nosotros hemos visto que la producción de virus llega a un máximo al final de la fase aguda tras lo cual la titulación de virus en el sobrenadante permanece constante. Estudios previos en células C6/36 infectadas persistentemente, describían que la tasa de crecimiento del virus era fluctuante con el tiempo, con picos máximos y mínimos (Newton y cols., 1981). Las diferencias con nuestros resultados pueden deberse a que en estos experimentos las células se pasaban periódicamente, de forma que se dividían y mantenían en un estado metabólico activo, mientras que en los nuestros se analizó únicamente la primera etapa de la persistencia sin realizar nunca el pase de las células.

Posibles explicaciones son que la producción y liberación activa de virus al sobrenadante podría verse influida por el aporte de nutrientes con el pase celular. De hecho, esto se correlaciona con lo que sucede en los mosquitos en la naturaleza, ya que la concentración de virus en la saliva se activa con el aporte de nutrientes tras la alimentación (Borucki y cols., 2002).

Por otro lado, al dividirse las células activamente no sabemos cómo se comportarían frente a la infección las células hijas. Si cabría la posibilidad de que en algunas células, en las que el “N-body” dejó de ser detectable, se mantendría la persistencia o pasarían otra vez por alguna fase de tipo agudo. Para averiguarlo, deberíamos estudiar el comportamiento de las células infectadas persistentemente inmediatamente después de realizar los pases celulares.

Otro factor que habría que tener en cuenta es el efecto de dilución en los recuentos de viriones infectivos que se introduce en los estudios de Newton. Este efecto de dilución, que ocurriría por retirar el sobrenadante y añadir medio de cultivo fresco con el pase de las células, podría explicar la existencia de picos mínimos. Posteriormente, la

cantidad de virus liberados iría en aumento hasta alcanzar picos máximos. Tras este análisis podríamos concluir que el bloqueo de la infección que se observa en células de mosquito no sería total, ya que con el tiempo la producción de virus permanecería activa. En conclusión, la célula no elimina el virus pero lo mantiene bajo control.

Los cambios celulares asociados a la fase aguda demuestran que las células de mosquito presentan una reacción inicial a la infección.

La formación de los “N-bodies” coincide con el estancamiento de la liberación de virus, y con el principio de la recuperación de la morfología celular normal. Por ello, pensamos que podría tener funciones defensivas. En estas estructuras se produciría el secuestro de NC, L y probablemente de las RNPs virales. De esta forma, al encontrarse inaccesibles las RNPs, se dificultaría el ensamblaje de nuevos virus, y al estar inaccesibles NC y L se dificultaría también la replicación y transcripción del genoma.

El marcaje remanente de Gc en la fase aguda, podría deberse a una traducción viral basal o a una acumulación de Gc que permanecería retenida en el Golgi de forma vestigial esperando la llegada de RNPs para realizar el ensamblaje. Un posible experimento que podría probar la generación activa o no de RNA viral en la fase de persistencia sería un ensayo de pulso y caza de incorporación de análogos de nucleótido, como la bromo-uridina o la etinil-uridina. Este tipo de experimentos han sido realizados por nosotros en células de mamífero, con lo que pudimos corroborar que la replicación del BUNV en células de mamífero se producía en estructuras con membranas derivadas del Golgi y no en el citoplasma (Fontana y cols., 2008). Sin embargo, no se ha conseguido todavía la puesta a punto de estos mismos ensayos en células de mosquito.

Un fenómeno similar a la formación de los “N-bodies” en células de mosquito infectadas con BUNV, se da en células de mamífero infectadas con el orthobunyavirus LACV. En ellas, se forman unas acumulaciones de proteína NC que los autores denominan estructura tipo agresoma atípico porque, a diferencia de lo observado en los agresomas, estas acumulaciones de NC no están asociadas al citoesqueleto de vimentina ni al centro organizador de microtúbulos. En estas estructuras el reclutamiento de NC se produce activamente por la interacción con la proteína MXA. De esta forma, tras disminuir la concentración de la proteína NC por debajo de un nivel crítico se bloquearía la amplificación del genoma, aunque no se afectaría la transcripción de proteínas virales (Kochs y cols., 2002).

Las proteínas Mx pertenecen a la superfamilia de las dinaminas, GTPasas de gran tamaño que se encuentran en levaduras, plantas y animales (Haller y cols., 1998), y que comparten propiedades funcionales con otros miembros de esta superfamilia involucrados en endocitosis y tráfico vesicular entre compartimentos membranosos intracelulares. La proteína MXA tiene actividad GTPasa, forma oligómeros en forma de

varilla y anillo *in vitro*, y tiene la propiedad de unirse y transformar membranas artificiales en estructuras tubulares. En las células, MXA se encuentra asociada a membranas del RER (Reichelt y cols., 2004). Sin embargo, MXA no es una dinamina convencional ya que su expresión es estrictamente dependiente de IFN de tipo I, que se induce como respuesta a la infección (Reichelt y cols., 2004). La unión de IFN a sus receptores específicos activaría la ruta de señalización JAK/STAT que activa más de 50 genes incluyendo los genes MX (Stark y cols., 1998).

Las proteínas MX tienen una actividad antiviral general. Por ejemplo, MXA es capaz de inhibir la replicación de virus de las familias *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae* y *Bunyaviridae* (Miura y cols., 2001).

Estudios con el virus Thogoto (familia *Orthomyxoviridae*) indican que la proteína de ratón MX1 reconoce las nucleoproteínas virales y previene la entrada de las mismas en el núcleo celular, que es el sitio de transcripción y replicación viral. Para el reconocimiento de las dianas son necesarios el dominio de unión a GTP y las funciones efectoras que se encuentran extremo carboxilo terminal (Kochs y cols., 2000). En general, las GTPasas MX parece que detectan la infección viral por reconocimiento de estructuras tipo nucleocápsida. Como consecuencia, estos componentes virales serían atrapados y secuestrados en localizaciones en donde dejarían de estar disponibles para la generación de nuevas partículas virales (Haller y cols., 2007).

Siguiendo esta dirección, dada la importante similitud morfológica con los “N-bodies” en células C6/36 infectadas con BUNV intentamos buscar un homólogo de MXA en células de insecto, ya que aunque estas células carecen de respuesta IFN, conservan rutas como Toll, JAK/STAT, y Imd/jnk que se activan en mosquitos infectados con arbovirus (Keene y cols., 2004). Se ha reportado que *D. melanogaster* contiene múltiples formas de dinamina, específicas de tejido y reguladas durante el desarrollo (Chen y cols., 1991; González-Bellido y cols., 2009). Realizamos estudios de co-localización de dinamina y NC en células de mosquito mediante microscopía confocal pero, hasta la fecha, no se ha visto co-localización clara de ambas proteínas en los “N-bodies”.

En un futuro, una aproximación más idónea para identificar los factores celulares importantes en la formación de los “N-bodies” podría ser abordando el estudio mediante experimentos de inmunoprecipitación con anticuerpos anti-NC en células infectadas con BUNV (o con anti-V5 en células infectadas con rBUNL4-V5), y posterior secuenciación por espectrometría de masas de las proteínas que interaccionan con NC (o L). Tras ello, se podrían estudiar específicamente las proteínas celulares identificadas y que podrían tener un papel en la respuesta celular que da lugar a los “N-bodies”.

La formación de prolongaciones sustentadas por tubulina podría tener dos lecturas. Podrían ser estructuras inducidas por el virus para transmitirse mejor entre células o, alternativamente, ser producidas por las células para advertir a células adyacentes de la infección con el fin de que pudiesen iniciar rápidamente la activación de cascadas con función antiviral.

Muchos virus son capaces de transmitirse a través de prolongaciones celulares, ya sea por el interior de estas o por los espacios extracelulares (Ritzenthaler, 2011). Un conocido ejemplo son las sinapsis virales (Felts y cols., 2010). Estas estructuras se vieron también en el hantavirus Sin Nombre y se propusieron como sitios de liberación de la progenie viral (Goldsmith y cols., 1995).

Nosotros, tras el estudio en profundidad de multitud de células, no hemos podido identificar virus viajando por el interior de las prolongaciones aunque no podemos descartar la presencia de virus o RNPs en los puentes citoplásmicos, ya que hemos visto la colocalización de NC y L en estas estructuras. Tampoco hemos visto un aumento significativo de los virus en el espacio extracelular en el entorno de las prolongaciones, tanto por TEM como por microscopía de fluorescencia. De hecho, si realizamos IFA con anticuerpos anti-BUNV de células infectadas sin retirar el medio de cultivo ni permeabilizar, se puede ver el halo de virus liberados alrededor del cuerpo de las células, sin que sea significativo en las prolongaciones.

Células infectadas con BUNV recombinantes en los que la proteína NSs ha sido deletada presentan menores cambios morfológicos y menores prolongaciones durante la fase aguda, sugiriendo que estos cambios pueden estar relacionados con un mecanismo de defensa que permitiría a las células hacer frente a la severa infección viral (Szemiel y cols., 2012).

Las células de mosquito son capaces de transportar la señal defensiva del RNA de interferencia a través de prolongaciones. En el trabajo de Attarzadeh-Yazdi, se describe cómo el siRNA se transporta entre células U4.4 (derivadas de *Ae.albopictus*) que están en contacto (Attarzadeh-Yazdi y cols., 2009).

Hay estudios que sugieren que las células C6/36 podrían ser deficientes en la respuesta de RNA de interferencia ya que poseerían una proteína Dicer deletada (Brackney y cols., 2010). Sin embargo, estas células sí producen pequeños oligonucleótidos aunque de un tamaño diferente al perfil típico observado en la respuesta antiviral mediante iRNA. Estos perfiles de pequeños oligonucleótidos son indicativos de una respuesta antiviral mediante la ruta PIWI. Esto implica que no son defectivos en la respuesta iRNA sino que utilizarían una ruta alternativa a la exo-siRNA, la ruta piRNA (Hess y cols., 2011).

El fenómeno de formación de prolongaciones en células de mosquito ha sido descrito con anterioridad en estudios de toxicidad. Locke observó una rápida inducción de filopodios en células de mosquito bajo condiciones de estrés (Locke, 1987). De forma similar, hay estudios que describen que al tratar células C6/36 con Cobre se produce la inducción de la apoptosis, procesos de fagocitosis, extrusión de lisosomas y producción de prolongaciones sustentadas por microtúbulos, que desaparecen tras eliminar el cobre y añadir medio de cultivo fresco. Estas prolongaciones llevan a un incremento de los contactos intercelulares que inducen la formación de agregados. Los autores sugirieron la expresión de factores similares a clusterina durante este proceso (Raes y cols., 2000).

De la misma manera, cambios en la morfología celular similares a los que hemos descrito en este trabajo se observaron también en células C6/36 tratadas con concentraciones subletales de Cadmio y Mercurio. Las células emitían proyecciones que contenían microtúbulos y que daban a las células una apariencia neuronal. Estas prolongaciones desaparecían tras 12 h de tratamiento continuado. Los autores apuntan a la activación de rutas de señalización que podrían ser compartidas por varios procesos de estrés y que permitirían la supervivencia final de las células. Estos mecanismos están aún por dilucidar (Braeckman y cols., 1997 a y b).

En cualquier caso, las células C6/36 son capaces de formar puentes citoplasmáticos que conectan células adyacentes bajo determinadas condiciones (Bukauskas y cols., 1992). En consonancia con estos estudios, en el presente trabajo hemos visto que las prolongaciones que se producen durante la fase aguda de la infección no producen únicamente meros contactos entre membranas sino verdaderos puentes citoplasmáticos. Esto fue confirmado al utilizar la sonda citoplásmica calceína y observar que era capaz de repartirse entre células en contacto. Además, en algunas de las secuencias de video-microscopía con el virus recombinante rBUNM-NSm-EGFP vimos el traspaso de material fluorescente de una célula a otra.

Antes de la entrada en persistencia, las células ya han liberado una gran cantidad de virus infectivos sin que se cause un daño irreversible. Creemos que esto podría ser debido a las peculiaridades de la ruta morfogenética viral en este tipo celular que, a diferencia de lo que ocurre en células de mamífero, no produciría una modificación dramática del sistema de endomembranas.

Por su naturaleza larvaria, el Golgi de las células C6/36 se encuentra desensamblado (Kondylis y cols., 2001), de forma similar a lo que sucede durante la mitosis de células de mamífero (Colanzi y cols., 2003). Este hecho hace que sea más complicado el análisis ultraestructural mediante TEM de la factoría y la morfogénesis viral porque estos procesos se encuentran repartidos por todo el citoplasma, en lugar de en una zona concreta. Respecto a la morfogénesis viral, hemos visto que el ensamblaje se produce en

Golgi por lo que, como se presumía, las señales de retención en Golgi de Gn y NSm siguen siendo funcionales en mosquito. El BUNV no necesita para su ensamblaje un Golgi estructuralmente intacto sino funcional (Salanueva y cols., 2003). Aunque el aparato de Golgi de células larvarias de mosquito se encuentra desorganizado, mantiene su polaridad y funcionalidad (Kondylis y cols., 2001).

Para evaluar la importancia de este factor, además de para facilitar los análisis ultraestructurales de la factoría viral, sería interesante el estudio de células de mosquito con un aparato de Golgi bien desarrollado. Sin embargo, no hay líneas celulares establecidas derivadas de *Ae.albopictus* de origen adulto, las cuales tendrían un Golgi maduro similar al de células de mamífero (BHK-21 o Vero). Alternativamente, se podrían estudiar células primarias a partir de explantes de tejidos de mosquitos adultos, o tratar con ecdisona, la hormona de la muda de artrópodos, las líneas celulares disponibles de origen larvario. En la naturaleza, la ecdisona provoca la reorganización del Golgi para formar un dictiosoma complejo similar al que existe en células de mamífero (Kondylis y cols., 2001).

El estado de desarrollo de las células podría ser un factor importante a tener en cuenta, ya que se ha visto que el LACV produce infecciones sin efectos citopáticos en la línea celular neuronal en estado diferenciado NT2N, mientras que en la línea parental indiferenciada uNT2 produce infecciones de tipo lítico (Pekosz y cols., 1996)

Existen varios factores que podrían determinar por qué la infección del BUNV resulta menos citopatogénica en células de mosquito que en células de mamífero. Durante la infección viral en células de mosquito no se produce una fragmentación de las endomembranas y no existen señales evidentes de citopatogenicidad, excepto la formación de autofagosomas y la condensación de mitocondrias. Los virus no se acumulan dilatando los compartimentos de ensamblaje, sino que se liberan rápidamente. Además, el mecanismo de ensamblaje es menos severo para la célula, se produce por envoltura (“wrapping”) en los extremos de los dictiosomas del Golgi, con lo que el resto de las cisternas se encuentran morfológicamente intactas. Por último, al contrario de lo que ocurre en células de mamífero, en las células de mosquito quedan intactos dictiosomas completos que permitirían a las células seguir con sus funciones, como se puede observar mediante estudios de co-localización de marcadores del Golgi con glicoproteínas virales.

Por el contrario, en células de mamífero la formación de la factoría viral causa una dramática reorganización de las endomembranas y orgánulos celulares (Salanueva y cols., 2003). Este bloqueo de las funciones de la célula, junto con el silenciamiento de la síntesis proteica (Thomas y cols., 2004), produce un colapso generalizado que lleva a la muerte de la célula.

Los virus que se ensamblan en células de mosquito, al formarse mediante envolvimiento, adquieren una doble envuelta. En este trabajo, hemos visto que estos virus de doble envuelta aparecen siempre unidos a unos filamentos de naturaleza desconocida. Al aislar los virus extracelulares se producía la co-purificación en las fracciones ricas en virus de una proteína que, por análisis de espectrometría de masas, se vio que era similar a actina. De igual forma, se vio que la morfología de estas estructuras co-purificadas con el virus, visualizadas por TEM tras sombreado metálico con Tántalo, era filamentosa y parecida a elementos del citoesqueleto.

Este fenómeno, exclusivo de la infección en mosquito y no en mamífero, ocurre también en otros virus como el virus de la inmunodeficiencia humana (Gladnikoff y cols., 2009). Para corroborar la implicación de la actina en la salida de las partículas virales, habría que realizar experimentos complementarios, como estudios de inmunomarcaje con partículas de oro coloidal en fracciones de virus purificados o células criosustituidas. También se podría estudiar el efecto que tendría un ataque a la actina celular en la liberación de nuevos virus. En células de mamífero, las partículas virales salen viajando en el interior de vesículas del sistema endosomal (Salanueva y cols., 2003; Novoa y cols., 2005 b). También se tendrá que seguir investigando el papel de la actina en las factorías virales de células de mosquito.

Otras de las diferencias observadas en la infección del BUNV entre células de mosquito y mamífero, es la composición de las glicoproteínas de la envuelta de los viriones. Mientras que las glicoproteínas de los viriones generados por células de mamífero son de tipo complejo o maduro, las de los viriones producidos en células de mosquito son de tipo inmaduro, de forma similar a los virus de tipo inmaduro que se encuentran en el interior de células de mamífero. Adicionalmente, la estructura de los viriones producidos por células de mosquito es más parecida a la estructura de los virus inmaduros de células de mamífero que a los virus maduros extracelulares.

La infectividad de los diferentes estados de maduración de los virus BUNV en células de mamífero está determinada por la composición de los azúcares de las glicoproteínas de la envuelta y esto, a su vez, determina también la estructura del virión (Salanueva y cols., 2003, Novoa y cols., 2005 b). Según nuestras observaciones, la infectividad de los viriones liberados por células de mosquito debería ser equiparable a la de los intermediarios inmaduros intracelulares poco infectivos de células de mamífero, en lugar de a la alta infectividad de los viriones. Sin embargo, la alta infectividad de los virus extracelulares de ambos orígenes es equivalente. Esto puede deberse al hecho de que el procesamiento de los glicanos en células de insecto difiere al procesamiento que ocurre en células de mamífero. En células de mamífero, tras una eliminación progresiva de residuos manosa a lo largo del dictiosoma del Golgi, se produce la adición de residuos de tipo complejo, como galactosa, ácido siálico o N-

acetilglucosamina (Moremen y cols., 2012). Este mismo proceso en células de mosquito consiste únicamente en la eliminación de residuos de manosa por lo que, aunque los azúcares son reconocidos por la enzima endoH, no son del tipo inmaduro convencional (es decir, de alto contenido en manosa), sino azúcares maduros de tipo artrópodo (es decir, de bajo contenido en manosa pero sin la adición de otros residuos de tipo complejo) (Tomiya y cols., 2004).

En resumen, los viriones liberados por las células de ambos orígenes, mamífero y artrópodo, a pesar de sus diferencias morfológicas conservan las mismas propiedades de infectividad, debido probablemente a que las glicoproteínas de la envuelta, aun teniendo distinta composición y estructura, son capaces de interaccionar exitosamente con los receptores de membrana en ambos tipos celulares.

Otro hecho característico que hemos observado durante la infección por el BUNV en células de mosquito es la formación de autofagosomas y la extrusión de compartimentos ácidos tipo lisosoma al final de la fase aguda. A falta de completar información con experimentos adicionales, se podría sugerir un mecanismo de eliminación de estructuras celulares cuya funcionalidad hubiese sido alterada por el virus.

La autofagia es una respuesta celular a la inanición así como un control de calidad para eliminar orgánulos dañados del citoplasma que está relacionada con diversas rutas de desarrollo y con diferentes enfermedades (Shintani y Klionsky, 2004). Además, podría ser un mecanismo de defensa frente a patógenos (Kirkegaard y cols., 2004). Recientemente se ha visto que el reconocimiento de epítomos virales por el receptor Toll-7 en células de *D. melanogaster* activa fenómenos de autofagia (Nakamoto y cols., 2012).

En resumen, en el presente trabajo se han propuesto una serie de hipótesis que creemos permitirán el desarrollo de futuros proyectos en los cuales se podrán estudiar individualmente y en profundidad los diferentes fenómenos aquí analizados, en particular los mecanismo de defensa antiviral detectados en las células de mosquito infectadas por el BUNV.

2. Posibles funciones de la proteína viral NSm.

Poco se sabe acerca de las funciones de las proteínas no estructurales que se traducen del segmento genómico M, llamadas proteínas NSm, en los bunyavirus.

Estas proteínas NSm existen en la mayoría de los virus del género *Phlebovirus* y *Tospovirus*, además de los *Orthobunyavirus* (Schmaljohn y Hooper, 2001).

En tospovirus se ha visto que NSm está implicada en la formación de túbulos y sintomatología causada por el virus Impatiens Necrotic Spot (Li y cols., 2009). Esta NSm funciona en plantas como proteína de movimiento que transporta RNPs de célula a célula y se localiza en estructuras tubulares que atraviesan los plasmodesmos (Kormelink y cols., 2011; Dietzgen y cols., 2012). También forma estructuras tubulares que protruyen de la periferia celular, en células de insecto transfectadas con la proteína Nsm del virus Tomato Spotted Wilt (Storms y cols., 1995).

En phlebovirus, NSm no es esencial para la replicación en cultivos celulares de mamífero. Estudios con el RVFV han demostrado que esta proteína tiene funciones anti-apoptóticas localizadas en el extremo carboxilo terminal y que afectan a la patogénesis viral, aunque no se conoce el mecanismo en detalle (Terasaki y cols., 2012). Parece que los efectos de esta NSm se producirían por activación de la cascada de la MAPK p38, que se activa en respuesta a una disminución en una enzima antioxidante, la superóxido dismutasa SOD1. Mutantes de esta proteína son más apoptóticos. Se cree que la inhibición de la apoptosis por NSm en RVFV aseguraría una eficiente producción de la progenie viral (Won y cols., 2007).

En el caso de los virus del género *Orthobunyavirus*, se sabe que sólo el extremo amino terminal (correspondiente al dominio I y parte del dominio II) es esencial (Pollitt y cols., 2006). Hay numerosos indicios que apuntan a funciones importantes en el ensamblaje viral en células de mamífero, en las que actuaría como proteína de andamiaje.

Por ejemplo, uno de estos indicios es que se localiza en la zona de ensamblaje, el aparato de Golgi (Nakitare y Elliott, 1993). También es necesaria para la adquisición de azúcares complejos en las glicoproteínas de la envuelta viral y se cree que NSm asistiría el plegamiento de estas glicoproteínas, de forma que los sitios de glicosilación quedasen accesibles a la acción de las diferentes enzimas del aparato de Golgi (Shi y cols, 2004). Otro comportamiento típico de las proteínas de andamiaje es que NSm está presente en la estructura de las partículas intracelulares inmaduras pero desaparece finalmente de la estructura de los viriones (Fontana y cols., 2008), comportamiento típico de las proteínas que asisten en el ensamblaje de las partículas virales (Dokland, 1999). Adicionalmente, se ha visto que NSm forma parte del dominio tubular de los orgánulos de replicación, elemento que se cree implicado en la conexión de la replicación con el ensamblaje dentro del aparato de Golgi (Fontanay cols., 2008).

En el presente trabajo se buscaba estudiar la proteína NSm en células de mamífero y de insecto, para averiguar su papel en el proceso de ensamblaje u otras funciones desconocidas. Para ello estudiamos diferentes aspectos de la infección con virus BUNV recombinantes con deleciones parciales en la proteína NSm: rBUNM-NSm Δ 3, rBUNM-NSm Δ 4 y rBUNM-NSm Δ 5.

En nuestros estudios en células de mamífero, vimos que dos de los mutantes (rBUNM-NSm Δ 3 y rBUNM-NSm Δ 4) producían una infección de curso más rápido y más citotóxica que la producida por el virus BUNV original. Extendiéndose la infección de forma prematura por la totalidad de la monocapa y produciéndose una acumulación de virus intracelulares que provocaban la dilatación de los compartimentos de ensamblaje. Vimos también una co-localización parcial de Gc en la membrana plasmática que coincidía con fenómenos de gemación incompleta. En principio, este fenotipo podría atribuirse a un defecto en las etapas de ensamblaje causadas por la delección parcial de NSm que provocase un retraso en la morfogénesis, resultando en una acumulación de virus inmaduros. Sin embargo, no hubo una reducción sustancial de la cantidad de virus infectivos liberados al sobrenadante.

En las células de mamífero infectadas con los mutantes de delección no se observaron orgánulos de replicación con dominios tubulares, únicamente dominios globulares. La proteína NSm presenta interacciones homotípicas (Shi y cols., 2006) y una delección en su secuencia podría provocar un defecto en este tipo de interacciones, de forma que se afectaría la capacidad de formar estructuras tubulares. Sin embargo, la ausencia de dominios tubulares en los orgánulos de replicación es dispensable para la replicación viral, ya que con todos los virus recombinantes se obtenían infecciones productivas. Además se sabe que los complejos replicativos están localizados en los dominios globulares (Fontana y cols., 2008).

Otra diferencia es que, aunque en las condiciones de nuestros experimentos los títulos de virus infectivos no fueron diferentes entre sí, los “stocks” de virus mutantes generados en células BHK-21 alcanzaban titulaciones dos órdenes de magnitud menores que las de los virus BUNV “wild type”. Nuestros experimentos se realizaron a una multiplicidad de 1 PFU/cel y tiempos cortos de incubación, pero para la preparación de “stocks” virales se realizaron infecciones a muy baja multiplicidad (0,001 PFU/cel) durante un tiempo más largo de incubación. De esta forma se obtienen más partículas virales en el sobrenadante, ya que al infectar a baja multiplicidad las células no mueren tan rápidamente y el cultivo celular se infecta progresivamente.

La deslocalización parcial de Gc a la membrana plasmática, en donde se ven fenómenos de gemación incompleta, podría atribuirse a un defecto en el procesamiento de Gc debido a la delección en NSm. Sin embargo, hay estudios que indican que las señales de localización de Gc son independientes de la proteína NSm y recaen únicamente en Gn (Lappin y cols., 1994). Estudios posteriores demostraron que NSm es capaz de interactuar con la cola citoplasmática de Gn (Shi y cols., 2006). Un defecto en esta interacción podría provocar la no retención de Gc en el Golgi, ya que para ello depende de Gn.

Por todo lo expuesto, pensamos que NSm, o al menos la región de NSm estudiada en este trabajo correspondiente a los aminoácidos del 354 al 426, podría tener una función de regulación negativa o auto-inhibición de la infección. El virus podría retrasar la muerte de las células de mamífero infectadas y, de esta forma, podrían seguir produciendo partículas virales.

Así se podría explicar el bajo título obtenido con los virus recombinantes en células BHK-21, que son células de roedor. Las células, al sufrir una infección de curso más rápido e intenso, morirían prematuramente impidiendo alcanzar un título mayor. Este fenómeno se observa también al prepararse “stocks” de virus BUNV “wild type” en células Vero. En estas células de primate la infección es más virulenta, de forma que las células se lisan rápidamente, siendo difícil conseguir una alta concentración de virus en los sobrenadantes. De forma análoga en la naturaleza, cuando un humano se infecta con el virus BUNV no se alcanzan los niveles de viremia necesarios para la subsecuente transmisión del virus a vectores artrópodos hematófagos, siendo normalmente una vía muerta para la transmisión (Borucki y cols., 2002).

Sin embargo, en roedores, los hospedadores habituales en la naturaleza, si se alcanzan los niveles de virus en sangre requeridos para la transmisión. Esto podría conferir una ventaja evolutiva al BUNV, ya que al tener un curso más benigno permitiría alcanzar una viremia más alta en los hospedadores, y consecutivamente un mejor mantenimiento en el ciclo natural.

Estudios realizados por el grupo del Prof. R. Elliott estimaron que los mutantes de NSm utilizados en nuestros experimentos, sobre todo el rBUNM-NSm Δ 4, no tendrían un impedimento importante en el ensamblaje, ya que mediante ensayos de mini-genoma eran capaces de producir la misma cantidad de partículas tipo virus (VLPs, del inglés “Virus Like Particles”) que el virus “wild type” (Shi y cols., 2006).

El mismo autor describió que estos virus mutantes de NSm tenían un retraso en el silenciamiento de la síntesis proteica del hospedador (Shi y cols., 2006). La proteína viral encargada de la inducción del silenciamiento de síntesis proteica celular es NSs. Esta proteína, que en el BUNV tiene una función anti-apoptótica (Kohl y cols., 2003), presenta interacciones con NSm (Shi y cols., 2006). En las infecciones con los mutantes de delección de la proteína NSm, rBUNM-NSm Δ 3 y rBUNM-NSm Δ 4, se observa un fenotipo inverso a lo que produce la proteína NSs. Una posible explicación podría ser que las mutaciones en NSm afectasen al dominio de interacción con NSs. Esta falta de interacción podría causar una disminución de la actividad de NSs. Sin embargo, se necesitarían más datos para probar esta hipótesis.

Si este fuese el caso se produciría una muerte prematura por lisis, hecho que el virus “wild type” podría retardar de alguna forma. Siguiendo esta dirección, se sabe que

el BUNV tiene propiedades anti-apoptóticas (Kohl y cols., 2003). De forma similar, hay virus que para contribuir al establecimiento de infecciones latentes u oncogénicas tienen más de un gen anti-apoptotico (Won y cols., 2007). Por ejemplo, se sabe que ocurre en virus grandes de DNA con bajos niveles de citotoxicidad, como adenovirus, papopavirus, herpesvirus, poxvirus y baculovirus (Callus y Vaux, 2007; Garnett y cols., 2006; Skaletskaya y cols., 2001; Roulston y cols., 1999; Shen y Shenk, 1995). Para virus pequeños de RNA hay menos datos pero se han descrito también en picornavirus (Buenz y Howe, 2006), virus de la hepatitis C (Saito y cols., 2006), virus respiratorio sincitial (Bitko y cols., 2007) e influenza A (Ehrhardt y cols., 2007).

Los estudios llevados a cabo en el presente trabajo con infecciones de virus recombinantes con delecciones parciales en la proteína NSm en células de mosquito (C6/36) van en la misma dirección. En este caso, estudiamos únicamente el mutante rBUNM-NSm Δ 4, ya que en estudios previos vimos que era muy similar al rBUNM-NSm Δ 3 pero provocaba una dilatación de los dictiosomas del Golgi ligeramente mayor. En este sistema celular, se vio también una entrada más rápida en la fase aguda de la infección acompañada de una dilatación de los compartimentos del Golgi y un mayor número de virus en las factorías. La entrada en persistencia, así como la formación de “N-bodies”, se producía de igual forma que con el virus “wild type”. Las células sobrevivían de igual forma y, en consecuencia, los títulos obtenidos al producir “stocks” virales en células C6/36, tanto del BUNV “wild type” como de los rBUNM-NSm Δ 3 o rBUNM-NSm Δ 4, eran parecidos entre sí y muy similares a los alcanzados por BUNV “wild type” en células BHK-21.

La proteína NSm del virus recombinante rBUNM-NSm Δ 5 se quedaba retenida en el RER. En células de mamífero, se observaron RER dilatados y colapsados probablemente debido a la acumulación de NSm. Debido a que la proteína mutante NSm Δ 5 no alcanzaba su localización funcional, el aparato de Golgi, no nos fue posible atribuir un papel específico para la región delecionada.

En resumen, en células de mamífero, las regiones de NSm analizadas son importantes para la formación del dominio tubular de los orgánulos de replicación. Sin embargo, estos túbulos no son esenciales para la replicación viral, evento localizado en los dominios globulares (Fontana y cols., 2008). NSm estaría involucrada en la correcta co-localización de la glicoproteína Gc, probablemente vía interacción con Gn.

La delección de estas secuencias en NSm provocó una infección más citopática, con lo que la proteína NSm podría tener un papel importante en el desarrollo de una infección menos severa que conferiría ventajas evolutivas en el ciclo de transmisión natural.

En células de mosquito, a pesar de provocar una fase aguda prematura y una dilatación más intensa de compartimentos membranosos intracelulares, la proteína NSm no es importante para el establecimiento de infecciones persistentes.

En el presente trabajo se proponen nuevas funciones para la proteína NSm del BUNV, pero para averiguar los mecanismos subyacentes serán necesarios más estudios. Estos estudios más detallados podrían incluir ensayos de inmunoprecipitación, para encontrar diferencias en las interacciones producidas por las proteínas NSm delecionadas, o estudios realizados en organismos completos, concretamente mosquitos.

3. Generación de BUNV recombinante con “tag” MT y puesta a punto del protocolo para su estudio mediante METTEM.

Los estudios convencionales de microscopía electrónica (ultraestructura e inmunomarcajes) no consiguieron revelar la estructura de los orgánulos de replicación en células de mosquito. Para abordar este estudio y conseguir datos estructurales de mayor resolución se desarrolló un método nuevo basado en el uso de un “tag” clonable para microscopía electrónica, y un virus recombinante con este “tag” fusionado a la polimerasa viral.

Los dos sitios que se eligieron para la inserción del “tag” de MT en la polimerasa viral, L4 (en el aminoácido 1935) y L5 (en el aminoácido 2046), se escogieron previamente en el laboratorio del Prof. Richard Elliott por ser regiones altamente variables, con pocos contactos entre residuos, altamente accesibles al solvente, y con ausencia de estructuras en α -hélice o β -lámina. Estas estimaciones se realizaron con la ayuda de predicciones bioinformáticas y el alineamiento con polimerasa del LACV y la del OROV (Shi y Elliott., 2009).

Gracias a este trabajo previo se consiguió la inserción de la MT en la posición L4 de la polimerasa. Esta polimerasa recombinante, al igual que la polimerasa fusionada con el epítipoV5 en el mismo lugar, tenía una actividad menor en comparación con la actividad de la polimerasa “wild type”. Aunque su actividad estaba disminuida, fue suficiente para la generación con éxito de virus recombinantes rBUNL4-MT y, por ello, apta para su futuro estudio mediante el método METTEM (Risco y cols., 2012).

Sin embargo, la obtención de una NSm fusionada con dos secuencias en tándem de la MT no fue posible ya que la proteína quimérica quedaba retenida en el RER, aunque el clonaje se realizó en el mismo sitio en el que previamente se había conseguido con éxito la inserción de la EGFP (en el aminoácido 403 de la poliproteína M, precursora de NSm). Es posible que la inserción de dos secuencias en tándem de la proteína MT produzca un plegamiento anómalo que provocaría la retención de NSm en

el RER y, por tanto, una localización incorrecta. Sería útil averiguar si el clonaje de sólo un monómero de MT podría ser más conveniente y dar lugar a virus recombinantes funcionales.

Consideramos que el virus rBUNL4-MT, generado en el presente trabajo, será una herramienta de estudio muy útil mediante el método METTEM.

El “tag” clonable de MT ha sido ya testado y puesto a punto en diferentes sistemas biológicos, tanto *in vitro* (Mercogliano y DeRosier, 2006 y 2007) como *in vivo* en células bacterianas (Diestra y cols., 2009 a y b) y eucariotas (Risco y cols., 2012).

Desde la generación de las proteínas de fusión con MT hasta el estudio final mediante METTEM, hay un largo camino de optimización de las condiciones experimentales (Risco y cols., 2012). En el presente trabajo, hemos estimado los tiempos máximos de incubación con sales de oro en los que no se observan signos de toxicidad, hemos comprobado que la expresión de proteína MT endógena no produce un fondo inespecífico detectable, debido probablemente a que los sitios de unión a metales se encuentran ya ocupados por el Zinc y Cobre celular (Beyersmann y Haase, 2001; Rae y cols., 1999). Hemos determinado también, que las células deben ser incubadas con medio de cultivo sin suplemento de FBS, ya que cuando lo añadimos al medio de cultivo se visualizaban “clusters” electrón-densos en el interior de endosomas. Probablemente esto sea debido a que el FBS contiene niveles basales de MT (Hidalgo y cols., 1994), u otras proteínas ricas en cisteína que se acomplejarían con las sales de oro.

También se han establecido las condiciones óptimas de crio-fijación mediante vitrificación en etano líquido de las monocapas celulares tratadas con oro, y de las condiciones de criosustitución en metanol con ausencia de agentes contrastantes, como el AcUr, que podrían interferir con la visualización de los “clusters” de oro bajo el ME.

Tras esta primera fase de puesta a punto, el sistema se encuentra ya disponible para estudiar los complejos replicativos del virus BUNV con técnicas de alta resolución. Esto permitiría la construcción de mapas moleculares que ayudarían a identificar y describir nuevas funciones, estructuras e interacciones.

Los complejos replicativos de BUNV en células de mamífero también podrán ser estudiados mediante crioET electrónica, puesto que los orgánulos de replicación ya han sido aislados a partir de células infectadas y disponemos de su caracterización preliminar *in vitro* (Fontana y cols., 2008).

En células de mosquito será también de gran utilidad, ya que ayudaría a la identificación de las estructuras que contienen los complejos replicativos, así como al estudio y seguimiento de los “N-bodies” y de las interacciones implicadas.

En conclusión, aunque el método METTEM resulta largo y laborioso en su desarrollo, permite localizar proteínas en células con alta sensibilidad y resolución molecular, por lo que pensamos que podrá proporcionar información única sobre la biogénesis y estructura de los complejos replicativos virales que sería, por el momento, imposible de obtener mediante otros protocolos de mapeo molecular.

CONCLUSIONES

1. El ciclo vital del BUNV en células de mosquito presenta tres etapas: temprana, similar a una fase de latencia; aguda, con alta expresión de proteínas virales y formación de prolongaciones celulares; y de persistencia, con un reclutamiento de NC y L en zonas citoplasmáticas concretas que hemos denominado “N-bodies” y una disminución de la expresión de proteínas virales y de la liberación de viriones.
2. En células de mosquito se ensamblan múltiples mini-factorías virales repartidas por toda la célula en posiciones periféricas, a diferencia de en células de mamífero donde la factoría viral es una, de gran tamaño y perinuclear. En mosquito, los virus no se acumulan en las células para sufrir transformaciones morfogénicas complejas, sino que se liberan rápidamente.
3. Existen múltiples factores que podrían estar interviniendo en la superación de la infección y desarrollo de persistencia en células de mosquito:
 - a. El mecanismo de formación de mini-factorías y la rápida liberación de virus es poco dañina para la célula porque, a diferencia de lo que sucede durante la formación de una gran factoría en células de mamífero, no se produce un cambio dramático en la ultraestructura celular y es posible que queden pequeños dictiosomas funcionales intactos.
 - b. Las proteínas NC y L localizadas en los “N-bodies” dejarían de estar disponibles para formar nuevos virus y asistir con sus funciones a la replicación y transcripción del genoma viral.
 - c. La formación de prolongaciones celulares y nuevas conexiones intercelulares podrían ser un mecanismo de defensa por el cual las células comunicasen la infección por el BUNV, activando un estado antiviral.
4. La proteína NSm parece tener un papel de regulación negativa de la infección por el BUNV. En ambos tipos celulares de mosquito y mamífero, al infectar con mutantes de delección parcial de la proteína se produce una infección más citotóxica y de curso más rápido. También, en células de mamífero, la proteína NSm es importante en la formación del dominio tubular de los orgánulos de replicación.
5. Se han obtenido virus recombinantes rBUNL4-MT viables que serán una valiosa herramienta para futuros estudios de mapeo molecular del complejo replicativo de BUNV con alta resolución. Se han optimizado los protocolos previos necesarios para el futuro estudio del rBUNL4-MT por el método METTEM.

BIBLIOGRAFÍA

- **Abraham G y Pattnaik AK.** (1983). Early RNA synthesis in Bunyamwera virus-infected cells. *J Gen Virol.* Jun. 64:1277-1290.
- **Acrani GO, Gomes R, Proença-Módena JL, da Silva AF, Carminati PO, Silva ML, Santos RI y Arruda E.** (2010). Apoptosis induced by Oropouche virus infection in HeLa cells is dependent on virus protein expression. *Virus Res.* 149:56-63.
- **Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, Goodbourn S y Randall RE.** (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:17264-17269.
- **Aranda C, Eritja R, y Roiz D.** (2006). First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. *Med Vet Entomol.* 20:150-152.
- **Attarzadeh-Yazdi G, Frangkoudis R, Chi Y, Siu RW, Ulper L, Barry G, Rodriguez-Andres J, Nash AA, Bouloy M, Merits A, Fazakerley JK y Kohl A.** (2009). Cell-to-cell spread of the RNA interference response suppresses Semliki Forest virus (SFV) infection of mosquito cell cultures and cannot be antagonized by SFV. *J Virol.* 83:5735-5748.
- **Azevedo RS, Nunes MR, Chiang JO, Bensabath G, Vasconcelos HB, Pinto AY, Martins LC, Monteiro HA, Rodrigues SG y Vasconcelos PF.** (2007). Reemergence of Oropouche fever, northern Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 13:912-915.
- **Barnett ED.** (2007). Yellow fever: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis.* 44:850-856.
- **Barr JN, Rodgers JW y Wertz GW.** (2006). Identification of the Bunyamwera bunyavirus transcription termination signal. *J Gen Virol.* 87:189-198.
- **Beaty BJ y Bishop DH.** (1988). Bunyavirus-vector interactions. *Virus Res.* 10:289-301.
- **Beaty BJ, Bishop DH, Gay M y Fuller F.** (1983). Interference between bunyaviruses in *Aedes triseriatus* mosquitoes. *Virol.* 127:83-90.
- **Beaty BJ, Sundin DR, Chandler LJ, Bishop DH Beaty BJ y Sundin DR.** (1985). Evolution of bunyaviruses by genome reassortment in dually infected mosquitoes (*Aedes triseriatus*). *Science.* 230:548-550.
- **Benedict, Levine RS, Hawley WA y Iounibos LP.** (2007). Spread of the Tiger: Global Risk of Invasion by the Mosquito *Aedes albopictus*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7: 76–85.
- **Best SM.** (2008). Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row. *Annu Rev Microbiol.* 62:171-192.
- **Beyersmann D y Haase H.** (2001). Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals.* 14:331-341.

- **Bishop DH, Calisher CH, Casals J, Chumakov MP, Gaidamovich SY, Hannoun C, Lvov DK, Marshall ID, Oker-Blom N, Pettersson RF, Porterfield JS, Russell PK, Shope RE y Westaway EG.** (1980). Bunyaviridae. Interviol. 14:125-143.
- **Bitko V, Shulyayeva O, Mazumder B, Musiyenko A, Ramaswamy M, Look DC Y Barik S.** (2007). Nonstructural Proteins of Respiratory Syncytial Virus Suppress Premature Apoptosis by an NF- κ B-Dependent, Interferon-Independent Mechanism and Facilitate Virus Growth. J Virol. 81:1786–1795.
- **Blakqori G, Delhaye S, Habjan M, Blair CD, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Attarzadeh-Yazdi G, Frangkoudis R, Kohl A, Kalinke U, Weiss S, Michiels T, Staeheli P y Weber F.J.** (2007). La Crosse bunyavirus nonstructural protein NSs serves to suppress the type I interferon system of mammalian hosts. Virol. 81:4991-4999.
- **Blakqori G, van Knippenberg I y Elliott RM.** (2009). Bunyamwera orthobunyavirus S-segment untranslated regions mediate poly(A) tail-independent translation. J Virol. 83:3637-3646.
- **Blakqori G y Weber F.** (2005). Efficient cDNA-based rescue of La Crosse bunyaviruses expressing or lacking the nonstructural protein NSs. J Virol. 79:10420-10428.
- **Bonilauri P, Bellini R, Calzolari M, Angelini R, Venturi L, Fallacara F, Cordioli P, Angelini P, Venturelli C, Merialdi G, y Dottori M.** (2008). Chikungunya virus in *Aedes albopictus*, Italy. Emerg Infect Dis. 14:852-854.
- **Borucki MK, Chandler LJ, Parker BM, Blair CD y Beaty BJ.** (1999). Bunyavirus superinfection and segment reassortment in transovarially infected mosquitoes. J Gen Virol. 80:3173-3179.
- **Borucki MK, Kempf BJ, Blitvich BJ, Blair CD y Beaty BJ.** (2002). La Crosse virus: replication in vertebrate and invertebrate hosts. Microbes Infect. 4:341-350.
- **Bowen MD, Trappier SG, Sanchez AJ, Meyer RF, Goldsmith CS, Zaki SR, Dunster LM, Peters CJ, Ksiazek TG y Nichol ST.** (2001). A reassortant bunyavirus isolated from acute hemorrhagic fever cases in Kenya and Somalia. RVF Task Force. Virol. 291:185-190.
- **Brackney DE, Scott JC, Sagawa F, Woodward JE, Miller NA, Schilkey FD, Mudge J, Wilusz J, Olson KE, Blair CD y Ebel GD.** (2010). C6/36 *Aedes albopictus* cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response. PLoS Negl Trop Dis. 4:e856.
- **Braeckman B, Simoens C, Rzeznik U y Raes H.** (1997 a). Effect of sublethal doses of cadmium, inorganic mercury and methylmercury on the cell morphology of an insect cell line (*Aedes albopictus*, C6/36). Cell Biol Int. 21:823-832.
- **Braeckman B, Raes H y Van Hove D.** (1997 b). Heavy-metal toxicity in an insect cell line. Effects of cadmium chloride, mercuric chloride and methylmercuric chloride on cell viability and proliferation in *Aedes albopictus* cells. Cell Biol Toxicol. 13:389-397.

- **Brayner FA, H.R.C. Araujo HRC, Cavalcanti MGS, Alves LC y Peixoto CA.** (2004). Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: Culicidae). *Micron*. 36:359–367.
- **Bridgen A, Dalrymple DA, Weber F y Elliott RM.** (2004). Inhibition of Dugbe nairovirus replication by human MxA protein. *Virus Res*. 99:47-50.
- **Bridgen A y Elliott RM.** (1996). Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:15400-15404.
- **Bridgen A, Weber F, Fazakerley JK y Elliott RM.** (2001). Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:664-669.
- **Briese T, Bird B, Kapoor V, Nichol ST y Lipkin WI.** (2006). Batai and Ngari viruses: M segment reassortment and association with severe febrile disease outbreaks in East Africa. *J Virol*. 80:5627-5630.
- **Briese T, Rambaut A y Lipkin WI.** (2004). Analysis of the medium (M) segment sequence of Guaroa virus and its comparison to other orthobunyaviruses. *J Gen Virol*. 85:3071-3077.
- **Buchholz UJ, Finke S y Conzelmann KK.** (1999). Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol*. 73:251-259.
- **Buenz EJ y Howe CL.** (2006). Picornaviruses and cell death. *Trends Microbiol*. 14:28-36.
- **Bukauskas F, Kempf C y Weingart R.** (1992). Electrical coupling between cells of the insect *Aedes albopictus*. *J Physiol*. 448:321–337.
- **Butt TM y Shields KS.** (1996). The Structure and Behavior of Gypsy Moth (*Lymantria dispar*) Hemocytes. *J Invert Pathol*. 68:1–14.
- **Cabezas P y Risco C.** (2006). Studying cellular architecture in three dimensions with improved resolution: Ta replicas revisited. *Cell Biol Int*. 30:747-754.
- **Callus BA y Vaux DL.** (2007). Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical. *Cell Death Differ*. 14:73-78.
- **Casals J.** (1963). Relationships among arthropod-borne animal viruses determined by cross-challenge test. *J Am J Trop Med Hyg*. 12:587-596.
- **Casals J y Whitman L.** (1960). A new antigenic group of arthropod-borne viruses: the Bunyamwera group. *Am J Trop Med Hyg*. 9:73-77.
- **Cash P.** (1982). Inhibition of La Crosse virus replication by monensin, monovalent ionophore. *J Gen Virol*. 59:193-196.

- **Chan J, Huang Z, Merrifield ME, Salgado MT y Stillman MJ.** (2002). Studies of metal binding reactions in metallothioneins by spectroscopic, molecular biology, and molecular modelling techniques. *Coord Chem Rev.* 233-234, 319–339.
- **Charrel RN, Gallian P, Navarro-Mari JM, Nicoletti L, Papa A, Sanchez-Seco MP, Tenorio A y Lamballerie X.** 2005. Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerg Infect Dis.* 11:1657-1663.
- **Chen MS, Obar RA, Schroeder CC, Austin TW, Poodry CA, Wadsworth SC y Vallee RB.** (1991). Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a *Drosophila* gene involved in endocytosis. *Nature.* 351:583-586.
- **Colanzi A, Sutterlin C y Malhotra V.** (2003). RAF1-activated MEK1 is found on the Golgi apparatus in late prophase and is required for Golgi complex fragmentation in mitosis. *J Cell Biol.* 161:27–32.
- **Colon-Ramos, D. A., P. M. Irusta, E. C. Gan, M. R. Olson, J. Song, R. I. Morimoto, R. M. Elliott, M. Lombard, R. Hollingsworth, J. M. Hardwick, G. K. Smith y S. Kornbluth.** (2003). Inhibition of translation and induction of apoptosis by Bunyaviral nonstructural proteins bearing sequence similarity to reaper. *Mol Biol Cell.* 14:4162-4172.
- **de Castro IF, Volonté L y Risco C.** (2012). Virus factories: biogenesis and structural design. *Cell Microbiol.* 2012 Sep 14. [Epub ahead of print].
- **Delarue M, Poch O, Tordo N, Moras D y Argos P.** (1990). An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng.* 3:461-467.
- **Diestra E, Fontana J, Guichard, P, Marco S y Risco C.** (2009 a). Visualization of proteins in intact cells with a clonable tag for electron microscopy. *J Struct Biol.* 165:157-168.
- **Diestra E, Cayrol B, Arluison V y Risco C.** (2009 b). Cellular electron microscopy imaging reveals the localization of the Hfq protein close to the bacterial membrane. *PLoS One.* 4:e8301.
- **Dietzgen RG, Martin KM, Anderson G y Goodin MM.** (2012). In planta localization and interactions of impatiens necrotic spot tospovirus proteins. *J Gen Virol.* 93:2490-2495.
- **Dokland T.** (1999). Scaffolding proteins and their role in viral assembly. *Cell Mol Life Sci.* 56:580-603.
- **Drake JW y Holland JJ.** (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:13910-13913.
- **Dubochet, J.** (2007). The physics of rapid cooling and its implications for cryoimmobilization of cells. *Methods Cell Biol.* 79:7-21.

- **Dunn EF, Pritlove DC, Jin H y Elliott RM.** (1995). Transcription of a recombinant bunyavirus RNA template by transiently expressed bunyavirus proteins. *Virol.* 211:133-143.
- **Ehrhardt C, Wolff T, Pleschka S, Planz O, Beermann W, Bode JG, Schmolke M y Ludwig S.** (2007). Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *J Virol.* 81:3058-3067.
- **Eifan SA y Elliott RM.** (2009). Mutational analysis of the Bunyamwera orthobunyavirus nucleocapsid protein gene. *J Virol.* 83:11307-11317.
- **Elliott RM.** (1989 a). Nucleotide sequence analysis of the Large (L) genomic RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family *Bunyaviridae*. *Virol.* 173:426-436.
- **Elliott RM.** (1989 b). Nucleotide sequence analysis of the Small (S) RNA segment of the Bunyamwera virus, the prototype of the family *Bunyaviridae*. *J. Gen. Virol.* 70:1281-1285.
- **Elliott RM.** (1990). Molecular biology of the *Bunyaviridae*. *J Gen Virol.* 71:501-522.
- **Elliott RM.** (1997). Emerging viruses: the *Bunyaviridae*. *Mol Med.* 3:572-577.
- **Elliott RM.** (2005). Negative strand RNA virus replication. En Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. *Virol.* Mahy B y ter Meulen V. eds. Hodder Arnold, Londres. 127-134.
- **Elliott RM.** (2009). Bunyaviruses and climate change. *Clin Microbiol Infect.* 15:510-517.
- **Elliott RM y Blakqori G.** (2011). Molecular biology of Orthobunyaviruses. En *Bunyaviridae*, molecular and cellular biology. Plyusnin A, Elliott RM., eds. Caister Academic Press, Norfolk, Reino Unido. 1-40.
- **Elliott RM, Schmaljohn CS y Collett MS.** (1991). *Bunyaviridae* genome structure and gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol.* 169:91-141.
- **Elliott RM y Wilkie ML.** (1986). Persistent infection of Aedes albopictus C6/36 cells by Bunyamwera virus. *Virol.* 150:21-32.
- **Farrell PJ, Balkow K, Hunt T, Jackson RJ y Trachsel H.** (1977). Phosphorylation of initiation factor eIF-2 and the control of reticulocyte protein synthesis. *Cell.* 11:187-200.
- **Fazakerley JK, Gonzalez-Scarano F, Strickler J, Dietzschold B, Karush F y Nathanson.** (1988). Organization of the middle RNA segment of snowshoe hare Bunyavirus. *Virol.* 167:422-432.
- **Felts RL, Narayan K, Estes JD, Shi D, Trubey CM, Fu J, Hartnell LM, Ruthel GT, Schneider DK, Nagashima K, Bess JW Jr, Bavari S, Lowekamp BC, Bliss D, Lifson JD y Subramaniam S.** (2010). 3D visualization of HIV transfer at the virological synapse between dendritic cells and T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:13336-13341.

- **Filippova M, Johnson MM, Bautista M, Filippov V, Fodor N, Tungteakkhun SS, Williams K y Duerksen-Hughes PJ.** (2007). The large and small isoforms of human papillomavirus type 16 E6 bind to and differentially affect procaspase 8 stability and activity. *J Virol.* 81:4116-4129.
- **Flick R y Pettersson RF.** (2001). Reverse genetics system for Uukuniemi virus (Bunyaviridae): RNA polymerase I-catalyzed expression of chimeric viral RNAs. *J Virol.* 75:1643-1655.
- **Flint JS, Enquist LW, Krug RM, Racaniello V y Shalka AM.** Eds. (2000). *Principles Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control.* ASM Press, Washington DC, EEUU.
- **Fontana J*, Lopez-Montero N* y Risco C.** (2007). Educational article: structural analysis of viral factories: from conventional microscopy to electron tomography. *Acta Micros.* 1-2:42-51. * J.F. and N. L.-M. contributed equally to this work.
- **Fontana J, Lopez-Montero N, Elliott RM, Fernandez JJ y Risco C.** (2008). The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex. *Cell Microbiol.* 10:2012-2028.
- **Fragkoudis R, Attarzadeh-Yazdi G, Nash AA, Fazakerley JK y Kohl A.** (2009). Advances in dissecting mosquito innate immune responses to arbovirus infection. *J Gen Virol.* 90:2061-2072.
- **Frese M, Kochs G, Feldmann H, Hertkorn C y Haller OJ.** (1996). Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MxA protein. *Virol.* 70:915-923.
- **Fujiki Y, Hubbard AL, Fowler S y Lazarow PB.** (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 93:97-102.
- **Galbraith CG y Galbraith JA.** (2011). Super-resolution microscopy at a glance. *J Cell Sci.* 124:1607-1611.
- **Gao S, von der Malsburg A, Paeschke S, Behlke J, Haller O, Kochs G y Daumke O.** (2010). Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA. *Nature.* 465:502-506.
- **Garnett TO, Philippova M y Duerksen-Hughes PJ.** (2006). Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* 13:1915-1926.
- **Garry CE y Garry R.** (2004). Proteomics computational analyses suggest that the carboxyl terminal glycoproteins of Bunyaviruses are class II viral fusion protein (beta-penetrenes). *Theor Biol Med Model.* 1:10.

- **Gerrard SR, Li L, Barrett AD y Nichol ST.** (2004). Ngari virus is a Bunyamwera virus reassortant that can be associated with large outbreaks of hemorrhagic fever in Africa. *J Virol.* 78:8922-8926
- **Gladnikoff M, Shimoni E, Gov NS y Rousso I.** (2009). Retroviral assembly and budding occur through an actin-driven mechanism. *Biophys J.* 97:2419-2428.
- **Gonzalez-Bellido PT, Wardill TJ, Kostyleva R, Meinertzhagen IA y Juusola M.** (2009). Overexpressing temperature-sensitive dynamin decelerates phototransduction and bundles microtubules in *Drosophila* photoreceptors. *J Neurosci.* 29:14199-14210.
- **Goldsmith CS, Elliott LH, Peters CJ y Zaki SR.** (1995). Ultrastructural characteristics of Sin Nombre virus, causative agent of hantavirus pulmonary syndrome. *Arch Virol.* 140:2107-2122.
- **Grabenbauer M, Geerts WJ, Fernandez-Rodriguez J, Hoenger A, Koster AJ y Nilsson T.** (2005). Correlative microscopy and electron tomography of GFP through photooxidation. *Nat Methods.* 2:857-862.
- **Gratz NG.** (2004). Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol.* 18:215-227.
- **Gubler DJ.** (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 11:480-496.
- **Hacker JK y Hardy JL.** (1997). Adsorptive endocytosis of California encephalitis virus into mosquito and mammalian cells: a role for G1. *Virol.* 235:40-47.
- **Hacker JK, Volkman LE y Hardy JL.** (1995). Requirement for the G1 protein of California encephalitis virus in infection in vitro and in vivo. *Virol.* 206:945-953.
- **Haller O y Kochs G.** (2002). Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic.* 3:710-717.
- **Haller O, Kochs G y Weber F.** (2006). The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virol.* 344:119-130.
- **Haller O, Frese M y Kochs G.** (1998). Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev Sci Tech.* 17:220-230.
- **Haller O, Stertz S y Kochs G.** (2007). The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins. *Microbes Infect.* 9:1636-1643.
- **Hart TJ, Kohl A y Elliott RM.** (2009). Role of the NSs protein in the zoonotic capacity of Orthobunyaviruses. *Zoonoses Public Health.* 56:285-296.
- **Harvell CD, Mitchell CE, Ward JR, Altizer S, Dobson AP, Ostfeld RS, y Samuel MD.** (2002). Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* 296:2158-2162.
- **Hentze MW.** (1997). eIF4G: a multipurpose ribosome adapter? *Science.* 275:500-501. Erratum in: *Science* 1997 275:1553.

- **Hess AM, Prasad AN, Ptitsyn A, Ebel GD, Olson KE, Barbacioru C, Monighetti C y Campbell CL.** (2011). Small RNA profiling of Dengue virus-mosquito interactions implicates the PIWI RNA pathway in anti-viral defense. *BMC Microbiol.* 11:45.
- **Hidalgo J, Gasull T, Giralt M y Armario A.** (1994). Brain metallothionein in stress. *Biol Signals.* 3:198-210.
- **Hinshaw VS, Olsen CW, Dybdahl-Sissoko N y Evans D.** (1994). Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. *J Virol.* 68:3667-3673.
- **Hillyer JF y Christensen BM.** (2002). Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Histochem Cell Biol.* 117:431-440.
- **Huang C, Thompson WH, Karabatsos N, Grady L y Campbell WP.** (1997). Evidence that fatal human infections with La Crosse virus may be associated with a narrow range of genotypes. *Virus Res.* 48:143-148.
- **Ishikawa H, Ma Z y Barber GN.** (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature.* 461:788-792.
- **Iwasaki A y Medzhitov R.** (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 5:987-995.
- **Jin H y Elliott RM.** (1991). Expression of functional Bunyamwera virus L protein by recombinant vaccinia viruses. *J Virol.* 65:4182-4189.
- **Jin H y Elliott RM.** (1992). Mutagenesis of the L protein encoded by Bunyamwera virus and production of monospecific antibodies. *J Gen Virol.* 73:2235-2244.
- **Jin H y Elliott RM.** (1993). Characterization of Bunyamwera virus S RNA that is transcribed and replicated by the L protein expressed from recombinant vaccinia virus. *J Virol.* 67:1396-1404.
- **Kanthong N, Laosutthipong C y Flegel TW.** (2010). Response to Dengue virus infections altered by cytokine-like substances from mosquito cell cultures. *BMC Microbiol.* 10:290.
- **Karabatsos N.** (1985). International catalogue of arbovirus, including certain other viruses of vertebrates. *Am Soc Trop Med Hyg.* 84-86.
- **Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T y Akira S.** (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature.* 441:101-115.
- **Keene KM, Foy BD, Sanchez-Vargas I, Beaty BJ, Blair CD y Olson KE.** (2004). RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; *Togaviridae*) infection of *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:17240-17245.

- **Kingsford L, Ishizawa LD y Hill DW.** (1983). Biological activities of monoclonal antibodies reactive with antigenic sites mapped on the G1 glycoprotein of La Crosse virus. *Viol.* 129:443-455.
- **Kirkegaard K, Taylor MP y Jackson WT.** (2004). Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat Rev Microbiol.* 2:301-314.
- **Klimas RA, Thompson WH, Calisher CH, Clark GG, Grimstad PR y Bishop DH.** (1981). Genotypic varieties of La Crosse virus isolated from different geographic regions of the continental United States and evidence for a naturally occurring intertypic recombinant La Crosse virus. *Am J Epidemiol.* 114:112-131.
- **Kochs G, Janzen C, Hohenberg H y Haller O.** (2002). Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:3153-3158.
- **Kohl A, Clayton RF, Weber F, Bridgen A, Randall RE y Elliott RM.** (2003). Bunyamwera virus nonstructural protein NSs counteracts interferon regulatory factor 3-mediated induction of early cell death. *J Virol.* 77:7999-8008.
- **Kohl A, Hart TJ, Noonan C, Royall E, Roberts LO, Elliott RM.** (2004). A Bunyamwera Virus Minireplicon System in Mosquito Cells. *J Virol.* 11:5679-5685.
- **Kokernot RH, Smithburn KC, de Meillon B y Paterson HE.** (1958). Isolation of Bunyamwera virus from a naturally infected human being and further isolations from *Aedes (Banksinella) circumluteolus* theo. *Am J Trop Med Hyg.* 7:579-584.
- **Kondylis V, Goulding SE, Dunne JC, y Rabouille C.** (2001). Biogenesis of Golgi stacks in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Cell.* 12:2308-2327.
- **Kormelink R, Garcia ML, Goodin M, Sasaya T y Haenni AL.** (2011). Negative-strand RNA viruses: the plant-infecting counterparts. *Virus Res.* 162:184-202.
- **Kuismanen E, Hedman K, Saraste J y Pettersson RF.** (1982). Uukuniemi virus maturation: accumulation of virus particles and viral antigens in the Golgi complex. *Mol Cell Biol.* 2:1444-1458.
- **LaJeunesse DR, Buckner SM, Lake J, Na C, Pirt A y Fromson K.** (2004). Three new *Drosophila* markers of intracellular membranes. *Biotechniques.* 36:784-788.
- **Lappin DF, Nakitare GW, Palfreyman JW y Elliott RM.** (1994). Localization of Bunyamwera bunyavirus G1 glycoprotein to the Golgi requires association with G2 but not with NSm. *J Gen Virol.* 75:3441-3451.
- **Lee SH, Shin JY, Lee A y Bustamante C.** (2012). Counting single photoactivatable fluorescent molecules by photoactivated localization microscopy (PALM). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:17436-17441.
- **Lee-Huang S, Lin Huang P y Lee Huang P.** (2011). Live-cell real-time imaging reveals role of mitochondria in cell-to-cell transmission of HIV-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 415:384-389.

- **Lees JF, Pringle CR y Elliott RM.** (1986). Nucleotide sequence of the Bunyamwera virus M RNA segment: conservation of structural features in the Bunyavirus glycoprotein gene product. *Virol.* 148:1-14.
- **Lehmann M, Rocha S, Mangeat B, Blanchet F, Uji-I H, Hofkens J y Piguet V.** (2011). Quantitative multicolor super-resolution microscopy reveals tetherin HIV-1 interaction. *PLoS Pathog.* 7:e1002456.
- **Leis A, Rockel B, Andrees L y Baumeister W.** (2009). Visualizing cells at the nanoscale. *Trends Biochem Sci.* 34:60-70.
- **Léonard VH, Kohl A, Hart TJ y Elliott RM.** (2006). Interaction of Bunyamwera Orthobunyavirus NSs protein with mediator protein MED8: a mechanism for inhibiting the interferon response. *J Virol.* 80:9667-9675.
- **Leonard VH, Kohl A, Osborne JC, McLees A y Elliott RM.** (2005). Homotypic interaction of Bunyamwera virus nucleocapsid protein. *J Virol.* 79:13166-1317.
- **Li W, Lewandowski DJ, Hilf ME y Adkins S.** (2009). Identification of domains of the Tomato spotted wilt virus NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology. *Virol.* 390:110-121.
- **Lim SI, Kweon CH, Yang DK, Tark DS y Kweon JH.** (2005). Apoptosis in Vero cells infected with Akabane, Aino and Chuzan virus. *J Vet Sci.* 6:251-254.
- **Locke M.** (1987). The very rapid induction of filopodia in insect cells. *Tissue Cell.* 19:301-318.
- **Lowe M, Rabouille C, Nakamura N, Watson R, Jackman M, Jämsä E, Rahman D, Pappin DJ y Warren G.** (1998). Cdc2 kinase directly phosphorylates the cis-Golgi matrix protein GM130 and is required for Golgi fragmentation in mitosis. *Cell.* 94:783-793.
- **Ludwig GV, Christensen BM, Yuill TM y Schultz KT.** (1989). Enzyme processing of La Crosse virus glycoprotein G1: a bunyavirus-vector infection model. *Virol.* 171:108-113.
- **Ludwig GV, Israel BA, Christensen BM, Yuill TM y Schultz KT.** (1991). Monoclonal antibodies directed against the envelope glycoproteins of La Crosse virus. *Microb Pathog.* 11:411-421.
- **Ludwig GV, Christensen BM, Yuill TM y Schultz KT.** (1989). Enzyme processing of La Crosse virus glycoprotein G1: a bunyavirus-vector infection model. *Virol.* 171:108-113.
- **Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A Y Flavell RA.** (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:5598-5603.

- **Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R y Iwasaki A.** (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med.* 198:513-520.
- **Mackenzie JS, Gubler DJ y Petersen LR.** (2004). Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med.* 12:S98–S109.
- **Madon MB, Mulla MS, Shaw MW, Kluh S y Hazelrigg JE.** (2002). Introduction of *Aedes albopictus* (Skuse) in southern California and potential for its establishment. *J Vector Ecol.* 27:149-154.
- **Maltezou HC y Papa A.** (2010). Crimean-Congo hemorrhagic fever: risk for emergence of new endemic foci in Europe?. *Travel Med Infect Dis.* 8:139-143.
- **McJunkin JE, de los Reyes EC, Irazuzta JE, Caceres MJ, Khan RR, Minnich LL, Fu KD, Lovett GD, Tsai T y Thompson A.** (2001). La Crosse encephalitis in children. *N Engl J Med.* 344:801-807.
- **Meister G, Landthaler M, Dorsett Y y Tuschl T.** (2004). Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA.* 10:544-550.
- **Mercogliano CP y DeRosier DJ.** (2006). Gold nanocluster formation using metallothionein: mass spectrometry and electron microscopy. *J Mol Biol.* 355:211-223.
- **Mercogliano, CP y DeRosier DJ.** (2007). Concatenated metallothionein as a clonable gold label for electron microscopy. *J Struct Biol.* 160:70-82.
- **Mironov AA y Beznoussenko GV.** (2012). Correlative light-electron microscopy a potent tool for the imaging of rare or unique cellular and tissue events and structures. *Methods Enzymol.* 504:201-219.
- **Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F y Roch P.** (1999). Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *J Cell Sci.* 112:4233-4242.
- **Miura TA, Carlson JO, Beaty BJ, Bowen RA y Olson KE.** (2001). Expression of human MxA protein in mosquito cells interferes with LaCrosse virus replication. *J Virol.* 75:3001-3003.
- **Mocellin S, Provenzano M.J.** (2004). RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology. *Transl Med.* 2:39.
- **Mohl BP y Barr JN.** (2009). Investigating the specificity and stoichiometry of RNA binding by the nucleocapsid protein of Bunyamwera virus. *RNA.* 15:391-399.
- **Moremen KW, Tiemeyer M y Nairn AV.** (2012). Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13:448-462.
- **Moya A, Elena SF, Bracho A, Miralles R y Barrio E.** (2000). The evolution of RNA viruses: A population genetics view. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:6967-6973.

- **Nakamoto M, Moy RH, Xu J, Bambina S, Yasunaga A, Shelly SS, Gold B y Cherry S.** (2012). Virus recognition by Toll-7 activates antiviral autophagy in *Drosophila*. *Immunity*. 36:658-667.
- **Nakamura N, Rabouille C, Watson R, Nilsson T, Hui N, Slusarewicz P, Kreis TE y Warren G.** (1995). Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J Cell Biol*. 131:1715-26.
- **Nakitare GW y Elliott RM.** (1993). Expression of the Bunyamwera virus M genome segment and intracellular localization of NSm. *Virol*. 195:511-520.
- **Netherton C, Moffat K, Brooks E y Wileman T.** (2007). A guide to viral inclusions, membrane rearrangements, factories, and viroplasm produced during virus replication. *Adv Virus Res*. 70:101-182.
- **Netherton CL, Wileman T.** (2011). Virus factories, double membrane vesicles and viroplasm generated in animal cells. *Curr Opin Virol*. 1:381-387.
- **Newton SE, Short NJ y Dalgarno L.** (1981). Bunyamwera virus replication in cultured *Aedes albopictus* (mosquito) cells: establishment of a persistent viral infection. *J Virol*. 38:1015-1024.
- **Nichol ST, Beaty B, Elliott RM, Goldbach R, Plyusnin A, Schmaljohn AR y Tesh RB.** (2005). Bunyaviridae, en: *Virus Taxonomy*. Editores: Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. y Ball, L. A. Amsterdam: Elsevier, 695-716.
- **Noske AB, Costin AJ, Morgan GP y Marsh BJ.** (2008). Expedited approaches to whole cell electron tomography and organelle mark-up in situ in high-pressure frozen pancreatic islets. *J Struct Biol*. 161:298-313.
- **Novoa RR, Calderita G, Arranz R., Fontana J, Granzow H y Risco C.** (2005 a). Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol Cell*. 97:147-172.
- **Novoa RR, Calderita G, Cabezas P, Elliott RM y Risco C.** (2005 b). Key Golgi factors for structural and functional maturation of bunyamwera virus. *J Virol*. 79:10852-10863.
- **Nunes MR, Travassos da Rosa AP, Weaver SC, Tesh RB y Vasconcelos PF.** (2005). Molecular epidemiology of group C viruses (Bunyaviridae, Orthobunyavirus) isolated in the Americas. *J Virol*. 79:10561-10570.
- **Ogawa Y, Sugiura K, Kato K, Tohya Y y Akashi H.** (2007). Rescue of Akabane virus (family *Bunyaviridae*) entirely from cloned cDNAs by using RNA polymerase I. *J Gen Virol*. 88:3385-3390.
- **Ogg MM y Patterson JL.** (2007). RNA binding domain of Jamestown Canyon virus S segment RNAs. *J Virol*. 81:13754-13760.
- **Okamura K, Ishizuka A, Siomi H y Siomi MC.** (2004). Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev*. 18:1655-66.

- **Osborne JC y Elliott RM.** (2000). RNA binding properties of bunyamwera virus nucleocapsid protein and selective binding to an element in the 5' terminus of the negative-sense S segment. *J Virol.* 74:9946-9952.
- **Overby AK, Pettersson RF, Grunewald K y Huiskonen JT.** (2008). Insights into bunyavirus architecture from electron cryotomography of Uukuniemi virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:2375-2379.
- **Patterson JL y Kolakofsky D.** (1984). Characterization of La Crosse virus small-genome transcripts. *J Virol.* 49:680-685.
- **Pattnaik AK y Abraham G.** (1983). Identification of four complementary RNA species in Akabane virus-infected cells. *J Virol.* 47:452-462.
- **Payne AF, Binduga-Gajewska I, Kauffman EB y Kramer LD.** (2006). Quantitation of flaviviruses by fluorescent focus assay. *J Virol Methods.* 134:183-189.
- **Pekosz A, Phillips J, Pleasure D, Merry D y Gonzalez-Scarano F.** (1996). Induction of apoptosis by La Crosse virus infection and role of neuronal differentiation and human bcl-2 expression in its prevention. *J Virol.* 70:5329-5335.
- **Pereira CF, Rossy J, Owen DM, Mak J y Gaus K.** (2012). HIV taken by STORM: super-resolution fluorescence microscopy of a viral infection. *Virol J.* 9:84.
- **Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Rehwinkel J, Kato H, Takeuchi O, Akira S, Way M, Schiavo G y Reis e Sousa C.** (2009). Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J Virol.* 83:10761-10769.
- **Plassmeyer ML, Soldan SS, Stachelek KM, Martin-Garcia J y Gonzalez-Scarano F.** (2005). California serogroup Gc (G1) glycoprotein is the principal determinant of pH-dependent cell fusion and entry. *Virol.* 338:121-132.
- **Poch O, Sauvaget I, Delarue M y Tordo N.** (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.* 8:3867-3874.
- **Pollitt E, Zhao J, Muscat P y Elliott RM.** (2006). Characterization of Maguari orthobunyavirus mutants suggests the nonstructural protein NSm is not essential for growth in tissue culture. *Virol.* 348:224-232.
- **Pringle CR, Lees JF, Clark W y Elliott RM.** (1984). Genome subunit reassortment among Bunyaviruses analysed by dot hybridization using molecularly cloned complementary DNA probes. *Virol.* 135:244-256.
- **Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC y O'Halloran TV.** (1999). Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science.* 284:805-808.
- **Raes H, Braeckman BP, Criel GR, Rzeznik U y Vanfleteren JR.** (2000). Copper induces apoptosis in Aedes C6/36 cells. *J Exp Zool.* 286:1-12.

- **Raju R y Kolakofsky D.** (1989). The ends of La Crosse virus genome and antigenome RNAs within nucleocapsids are base paired. *J Virol.* 63:122-128.
- **Randall RE y Goodbourn S.** (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol.* 89:1-47.
- **Reese SM, Beaty MK, Gabitzsch ES, Blair CD y Beaty BJ.** (2009). *Aedes triseriatus* females transovarially infected with La Crosse virus mate more efficiently than uninfected mosquitoes. *J Med Entomol.* 46:1152-1158.
- **Reese SM, Blitvich BJ, Blair CD, Geske D, Beaty BJ y Black WC 4th.** (2008). Potential for La Crosse virus segment reassortment in nature. *Virol J.* 5:164.
- **Reguera J, Weber F y Cusack S.** (2010). *Bunyaviridae* RNA polymerases (L-protein) have an N-terminal, influenza-like endonuclease domain, essential for viral cap-dependent transcription. *PLoS Pathog.* 6:e1001101.
- **Reichert M, Stertz S, Krijnse-Locker J, Haller O y Kochs G.** (2004). Missorting of LaCrosse virus nucleocapsid protein by the interferon-induced MxA GTPase involves smooth ER membranes. *Traffic.* 5:772-784.
- **Risco C, Sanmartín-Conesa E, Tzeng WP, Frey TK, Seybold V y de Groot RJ.** (2012). Specific, sensitive, high-resolution detection of protein molecules in eukaryotic cells using metal-tagging transmission electron microscopy. *Structure.* 20:759-766.
- **Ritzenthaler C.** (2011). Parallels and distinctions in the direct cell-to-cell spread of the plant and animal viruses. *Curr Opin Virol.* 1:403-409.
- **Robinson CV, Sali A y Baumeister W.** (2007). The molecular sociology of the cell. *Nature.* 450:973-982.
- **Roulston A, Marcellus RC y Branton PE.** (1999). Viruses and apoptosis. *Annu Rev Microbiol.* 53:577-628.
- **Rozhon EJ, Gensemer P, Shope RE y Bishop DH.** (1981). Attenuation of virulence of a bunyavirus involving an L RNA defect and isolation of LAC/SSH/LAC and LAC/SSH/SSH reassortants. *Virol.* 111:125-138.
- **Saito K, Meyer K, Warner R, Basu A, Ray RB y Ray R.** (2006). Hepatitis C virus core protein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis by a protective effect involving cellular FLICE inhibitory protein. *J Virol.* 80:4372-4379.
- **Salanueva IJ, Novoa RR, Cabezas P, Lopez-Iglesias C, Carrascosa JL, Elliott RM y Risco C.** (2003). Polymorphism and structural maturation of bunyamwera virus in Golgi and post-Golgi compartments. *J Virol.* 77:1368-1381.
- **Sanbonmatsu-Gámez S, Pérez-Ruiz M, Collao X, Sánchez-Seco MP, Morillas-Márquez F, de la Rosa-Fraile M, Navarro-Mari JM y Tenorio A.** (2005). Toscana virus in Spain. *Emerg Infect Dis.* 11:1701-1707.

- **Sanchez-Seco MP y Navarro JM.** (2005). Infections due to Toscana virus, West Nile virus, and other arboviruses of interest in Europe. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 23:560-568.
- **Sanchez-Vargas I, Travanty EA, Keene KM, Franz AW, Beaty BJ, Blair CD y Olson KE.** (2004). RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes. *Virus Res.* 102:65-74.
- **Santos RI, Rodrigues AH, Silva ML, Mortara RA, Rossi MA, Jamur MC, Oliver C y Arruda E.** (2008). Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification. *Virus Res.* 138:139-143.
- **Schmaljohn CS y Hooper JW.** (2001). Bunyaviridae. En DM Knipe y Fields PM. Eds. Lippincott Williams & Wilkins Howley. Philadelphia. *Virology*, 4th ed, pp. 1581–1602.
- **Schmaljohn CS y Nichol ST.** (2007). Bunyaviridae, en: *Fields Virology*, 5ª edición. Editores: Knipe, D. H. y Howley, P. H. Lippincott, Williams y Wilkins, a Wolters Kluwer Business. Filadelfia, Estados Unidos, 1741-1789.
- **Schmidt A, Schwerdt T, Hamm W, Hellmuth JC, Cui S, Wenzel M, Hoffmann FS, Michallet MC, Besch R, Hopfner KP, Endres S y Rothenfusser S.** (2009). 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:12067-12072.
- **Scott JC, Brackney DE, Campbell CL, Bondu-Hawkins V, Hjelle B, Ebel GD, Olson KE y Blair CD.** (2010). Comparison of dengue virus type 2-specific small RNAs from RNA interference-competent and -incompetent mosquito cells. *PLoS Negl Trop Dis.* 4:e848.
- **Shen Y y Shenk TE.** (1995). Viruses and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev.* 5:105-111.
- **Shi X, Brauburger K y Elliott RM.** (2005). Role of N-linked glycans on bunyamwera virus glycoproteins in intracellular trafficking, protein folding, and virus infectivity. *J Virol.* 79:13725-13734.
- **Shi X y Elliott RM.** (2009). Generation and analysis of recombinant Bunyamwera orthobunyaviruses expressing V5 epitope-tagged L proteins. *J Gen Virol.* 90:297-306.
- **Shi X, Goli J, Clark G, Brauburger K y Elliott RM.** (2009). Functional analysis of the Bunyamwera orthobunyavirus Gc glycoprotein. *J Gen Virol.* 90:2483-2492.
- **Shi X, Kohl A, Leonard VH, Li P, McLees A y Elliott RM.** (2006). Requirement of the N-terminal region of orthobunyavirus nonstructural protein NSm for virus assembly and morphogenesis. *J Virol.* 80:8089-8099.
- **Shi X, Kohl A, Li P y Elliott RM.** (2007). Role of the cytoplasmic tail domains of Bunyamwera orthobunyavirus glycoproteins Gn and Gc in virus assembly and morphogenesis. *J Virol.* 81:10151-10160.
- **Shi X, Lappin DF y Elliott RM.** (2004). Mapping the Golgi targeting and retention signal of Bunyamwera virus glycoproteins. *J Virol.* 78:10793-10802.

- **Shi X, van Mierlo JT, French A y Elliott RM.** (2010). Visualizing the replication cycle of bunyamwera orthobunyavirus expressing fluorescent protein-tagged Gc glycoprotein. *J Virol.* 84:8460-8469.
- **Shintani T. y Klionsky DJ.** (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science.* 306:990-995.
- **Shu X, Lev-Ram V, Deerinck TJ, Qi Y, Ramko EB, Davidson MW, Jin Y, Ellisman MH y Tsien RY.** (2011). A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms. *PLoS Biol.* 9:e1001041.
- **Skaletskaya A, Bartle LM, Chittenden T, McCormick AL, Mocarski ES y Goldmacher VS.** (2001). A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:7829-7834.
- **Smithburn KC, Haddow AJ y Mahaffy AF.** (1946). A Neurotropic Virus Isolated from Aedes Mosquitoes Caught in the Semliki Forest. *Am. J. Trop. Med.* S1-26:189-208.
- **Soldan SS, Plassmeyer ML, Matukonis MK y González-Scarano F.** (2005). La Crosse virus nonstructural protein NSs counteracts the effects of short interfering RNA. *J Virol.* 79:234-244.
- **Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH y Schreiber RD.** (1998). How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem.* 67:227-264.
- **Stearns T.** (1995). Green fluorescent protein. The green revolution. *Curr Biol.* 5:262-264.
- **Steven AC, Heymann JB, Cheng N, Trus BL y Conway JF.** (2005). Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. *Curr Opin Struct Biol.* 15:227-236.
- **Storms MM, Kormelink R, Peters D, Van Lent JW y Goldbach RW.** (1995). The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virol.* 214:485-493.
- **Streitenfeld H, Boyd A, Fazakerley JK, Bridgen A, Elliott RM y Weber F.** (2003). Activation of PKR by Bunyamwera virus is independent of the viral interferon antagonist NSs. *J Virol.* 77:5507-5511.
- **Styer LM, Lim PY, Louie KL, Albright RG, Kramer LD y Bernard KA.** (2011). Mosquito saliva causes enhancement of West Nile virus infection in mice. *J Virol.* 85:1517-1527.
- **Sundin DR, Beaty BJ, Nathanson N y Gonzalez-Scarano F.** (1987). A G1 glycoprotein epitope of La Crosse virus: a determinant of infection of Aedes triseriatus. *Science.* 235:591-593.

- **Szemiel AM, Failloux AB y Elliott RM.** (2012). Role of Bunyamwera Orthobunyavirus NSs Protein in Infection of Mosquito Cells. *PLoS Negl Trop Dis.* 6:e1823.
- **Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA y Beutler B.** (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:3516-3521.
- **Takeuchi O y Akira S.** (2009). Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev.* 227:75-86.
- **Terasaki K, Won S y Makino S.** (2012). The C-terminal region of Rift Valley fever virus NSm protein targets the protein to the mitochondrial outer membrane and exerts anti-apoptotic function. *J Virol.* 2012 Oct 24. [Epub ahead of print].
- **Tesh RB y Modi GB.** (1987). Maintenance of Toscana virus in *Phlebotomus perniciosus* by vertical transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 36:189-193.
- **Thomas D, Blakqori G, Wagner V, Banholzer M, Kessler N, Elliott RM, Haller O y Weber F.** (2004). Inhibition of RNA polymerase II phosphorylation by a viral interferon antagonist. *J Biol Chem.* 279:31471-31477.
- **Thompson WH, Beaty BJ.** (1977). Venereal transmission of La Crosse (California encephalitis) arbovirus in *Aedes triseriatus* mosquitoes. *Science.* 196:530-531.
- **Tomiya N, Narang S, Lee YC y Betenbaugh MJ.** (2004). Comparing N-glycan processing in mammalian cell lines to native and engineered lepidopteran insect cell lines. *Glycoconj J.* 21:343-360.
- **Tsai TF y Chandler LJ.** (2003). Arboviruses. En Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC, eds. *Manual of Clinical Microbiology.* 8th ed. ASM Press. Washington. 1553-1569.
- **van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carsten EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR y Wickner RB.** Eds. (2000). *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press. California. EEUU.
- **Vasilakis N, Deardorff ER, Kenney JL, Rossi SL, Hanley KA y Weaver SC.** (2009). Mosquitoes put the brake on arbovirus evolution: experimental evolution reveals slower mutation accumulation in mosquito than vertebrate cells. *PLoS Pathog.* 5:e1000467.
- **Verbruggen P, Ruf M, Blakqori G, Överby AK, Heidemann M, Eick D y Weber F.** (2010). Interferon antagonist NSs of La Crosse virus triggers a DNA damage response-like degradation of transcribing RNA polymerase II. *J Biol Chem.* 286:3681-3692.
- **Vialat P y Bouloy MJ.** (1992). Germiston virus transcriptase requires active 40S ribosomal subunits and utilizes capped cellular RNAs. *Virol.* 66:685-693.

- **Walter CT y Barr JN.** (2011). Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. *J Gen Virol.* 92:2467-2484.
- **Walter CT, Bento DF, Alonso AG y Barr JN.** (2011). Amino acid changes within the Bunyamwera virus nucleocapsid protein differentially affect the mRNA transcription and RNA replication activities of assembled ribonucleoprotein templates. *J Gen Virol.* 92:80-84.
- **Wang Q, Mercogliano CP y Löwe J.** (2011). A ferritin-based label for cellular electron cryotomography. *Structure.* 19:147-154.
- **Watret GE, Pringle CR y Elliott RM.** (1985). Synthesis of bunyavirus-specific proteins in a continuous cell line (XTC-2) derived from *Xenopus laevis*. *J Gen Virol.* 66:473-82.
- **Watts DM, Pantuwatana S, DeFoliart GR, Yuill TM y Thompson WH.** (1973). Transovarial transmission of LaCrosse virus (California encephalitis group) in the mosquito, *Aedes triseriatus*. *Science.* 182:1140-1141.
- **Weaver SC y Reisen WK.** (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* 85:328-345.
- **Weber F, Bridgen A, Fazakerley JK, Streitenfeld H, Kessler N, Randall RE y Elliott RM.** (2002). Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs counteracts the induction of alpha/beta interferon. *J Virol.* 76:7949-7955.
- **Weber F, Dunn EF, Bridgen A y Elliott RM.** (2001). The Bunyamwera virus nonstructural protein NSs inhibits viral RNA synthesis in a minireplicon system. *Virol.* 281:67-74.
- **Whitt MA, Mire CE.** (2011). Utilization of fluorescently-labeled tetracysteine-tagged proteins to study virus entry by live cell microscopy. *Methods.* 55:127-136.
- **Widlak P y Garrard WT.** (2005). Roles of the major apoptotic nuclease-DNA fragmentation factor in biology and disease. *Cell Mol Life Sci.* 66:263-274.
- **Wileman T.** (2007). Aggresomes and pericentriolar sites of virus assembly: cellular defense or viral design? *Annu Rev Microbiol.* 61:149-167.
- **Won S, Ikegami T, Peters CJ y Makino S.** (2007). NSm protein of Rift Valley fever virus suppresses virus-induced apoptosis. *J Virol.* 81:13335-13345.
- **Wymann MN, Flacio E, Radczuweit S, Patocchi N y Luthy P.** (2008). Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) - a threat for Switzerland?. *Euro Surveill.* 13:8058.
- **Yanase T, Kato T, Yamakawa M, Takayoshi K, Nakamura K, Kokuba T y Tsuda T.** (2006). Genetic characterization of Batai virus indicates a genomic reassortment between orthobunyaviruses in nature. *Arch Virol.* 151:2253-2260.
- **Yano H, Yamamoto-Hino M, Abe M, Kuwahara R, Haraguchi S, Kusaka I, Awano W, Kinoshita-Toyoda A, Toyoda H, y Goto S.** (2005). Distinct functional units of the Golgi complex in *Drosophila* cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:13467-13472.

- **Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S y Fujita T.** (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol.* 5:730-737.
- **Zeidner NS, Higgs S, Happ CM, Beaty BJ y Miller BR.** (1999). Mosquito feeding modulates Th1 and Th2 cytokines in flavivirus susceptible mice: an effect mimicked by injection of sialokinins, but not demonstrated in flavivirus resistant mice. *Parasite Immunol.* 21:35-44.

ANEXOS

Self-protection and survival of arbovirus-infected mosquito cells

Noelia López-Montero and Cristina Risco*

Cell Structure Lab, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain.

Summary

Arboviruses are serious pathogens for men but cause little damage to their arthropod vectors. We have studied how a mosquito cell line derived from one of the relevant vectors for arboviruses responds to Bunyamwera virus, a well-characterized arbovirus. Confocal, live cell microscopy and electron microscopy showed that Bunyamwera virus induces deep changes in mosquito cells. Early in infection these cells develop long projections and create new intercellular connections where cell organelles and viral proteins are detected. Live cell microscopy shows that these connections are developed before viral protein can be detected by immunofluorescence. Interestingly, their proliferation is accompanied by a progressive trapping of the nucleocapsid and RNA polymerase viral proteins into large cytoplasmic aggregates. A significant drop in the release of infectious virions then follows. Before that, numerous viruses assemble in peripheral Golgi stacks and they apparently exit the cells immediately since they do not accumulate intracellularly. This mechanism of assembly seems to cause little damage to the integrity of cell endomembranes. The characterization of the antiviral mechanisms operating in mosquito cells can be of great help in the fight against pathogenic arboviruses.

Introduction

Arboviruses, or arthropod-borne viruses, are important causes of epidemic and endemic disease in many countries all over the world (Woolhouse and Gaunt, 2007; Kyle and Harris, 2008). Most arboviruses are RNA viruses mainly of the families *Bunyaviridae*, *Flaviviridae* and *Togaviridae*. In nature, arboviruses are spread by arthropod vectors, predominantly mosquitoes, ticks, flies and

midges to vertebrate hosts (Weaver, 2006). Yellow fever, Dengue fever, West Nile fever, Rift Valley fever, La Crosse encephalitis, Chikungunya arthritis or Crimean-Congo haemorrhagic fever are some of the arbovirus-associated emerging and re-emerging diseases. With the only exception of Yellow fever virus there are no vaccines, nor efficient treatments, against pathogenic arboviruses.

In their vertebrate hosts, arboviruses generally counteract innate defences and trigger a highly cytopathic infection that leads inevitably to cell death. However, in mosquito cells an early phase of efficient viral protein synthesis and virus production is followed by a persistent infection with low levels of viral protein expression and virus release (Newton *et al.*, 1981; Brown, 1984; Scallan and Elliott, 1992). Little is known about how arthropod cells react to arbovirus infection, not even for Dengue, the most important human arbovirus with almost half of the world's population at risk (Kyle and Harris, 2008).

Orthobunyaviruses are a group of worldwide distributed negative stranded RNA arboviruses that belong to the *Bunyaviridae* family and whose prototype is Bunyamwera virus (BUNV). Many bunyaviruses can infect humans causing diseases that vary from febrile illness to fatal encephalitis. Among pathogenic bunyaviruses we can list the already mentioned Rift Valley fever virus, one of the most important pathogens in Africa (Flick and Bouloy, 2005), Crimean-Congo haemorrhagic fever virus, that causes a severe illness with high case fatality in Africa, Europe, the Middle East and Asia (Deyde *et al.*, 2006), and La Crosse virus, the leading cause of paediatric arboviral encephalitis in the USA (McJunkin *et al.*, 2001). Bunyaviruses are transmitted to mammalian hosts by haematophagous mosquitoes and the dissemination in recent years of one of their most relevant vectors *Aedes albopictus* (the Asian tiger mosquito) has generated much concern (Benedict *et al.*, 2007; Wymann *et al.*, 2008). After the success of this mosquito species in colonizing new territories, it is predicted that its range could increase further with climate change (Elliott, 2009). Once the vectors are present in a certain region the introduction of pathogenic arboviruses could be a matter of time (Mackenzie *et al.*, 2004).

The genome of Orthobunyaviruses is composed by three RNA segments of negative-sense polarity. The large segment (L) codes for an RNA-dependent RNA polymerase (L), the medium segment (M) codes for a

Received 10 May, 2010; revised 12 August, 2010; accepted 18 August, 2010. *For correspondence. E-mail crisco@cnb.csic.es; Tel. (+34) 91 585 4507; Fax (+34) 91 585 4506.

© 2010 Blackwell Publishing Ltd

precursor polyprotein (NH₂-Gn-NSm-Gc-COOH), which is co-translationally cleaved to yield the two virion glycoproteins (Gn and Gc) and a non-structural protein called NSm involved in morphogenesis, and the smallest segment (S) codes for the nucleocapsid (NC) protein and a second non-structural protein NSs, a virulence factor, in overlapping reading frames (Elliott, 1990). Virions are spherical, with an average diameter of 100 nm and icosahedral symmetry (Overby *et al.*, 2008). Although cell receptors for bunyaviruses have not been identified, it is known that the large glycoprotein Gc is essential for binding to mammalian cells while the small glycoprotein Gn plays that role in mosquito cells (Plassmeyer *et al.*, 2005).

Only limited information is available about the growth of bunyaviruses in intact mosquitoes and in cultured mosquito cells (Tesh and Gubler, 1975; Newton *et al.*, 1981). A number of hypotheses have been considered, but no clear understanding exists of the factor(s) responsible for the establishment of persistent infections, as opposed to cytopathic infections, in mosquito cells infected with arboviruses. One of the most important differences between BUNV replication in mammalian and mosquito cells is in the high levels of synthesis and accumulation of viral proteins in mammalian cells and the relative efficiency of infectious virus production in mosquito cells. It has been reported that viral protein synthesis in mosquito cells is low and is reduced to barely detectable levels by about 30 h post infection (p.i.) (Newton *et al.*, 1981). The shut off of host cell protein synthesis and the inhibition of IFN production in mammalian cells are caused by the BUNV NSs accessory protein that acts as a virulence factor in mammalian cells exclusively (Bridgen *et al.*, 2001; Kohl *et al.*, 2004). Bunyaviruses do not cause a shut off of cell protein synthesis in mosquito cells and although they do not have the interferon response of vertebrates, more efficient antiviral mechanisms must be operating in these cells since they survive to arbovirus infection.

Bunyaviruses are among the best studied viruses that bud into compartments of the secretory pathway, in this case the Golgi apparatus of mammalian cells (Jantti *et al.*, 1997; Salanueva *et al.*, 2003; Novoa *et al.*, 2005a,b). BUNV builds a large factory by recruitment of mitochondria and RER elements around the Golgi complex. Viral replication complexes assemble inside tubular structures that also serve as a physical link for recruited organelles (Fontana *et al.*, 2008). Assembly and maturation of new viral particles takes place in the Golgi stacks of the viral factory causing severe damage in the secretory pathway of the cell (Salanueva *et al.*, 2003). Looking for data that could shed new light about the non-cytotoxic response of arthropod cells to arboviruses in the present work we have studied the infection of a well-characterized arbovirus, the BUNV, in a mosquito cell line derived from *A. albopictus*, one of the relevant vectors for arboviruses. We have found

that during the acute phase of infection a complex network of filopodial-like bridges is induced and creates new inter-cellular contacts. These could serve for virus propagation but most likely for spreading protective signals between cells that almost simultaneously initiate a process of trapping and sorting of essential viral proteins into a large juxtanuclear structure. Unique features concerning virus factory assembly and viral morphogenesis have been also detected in mosquito cells. These can be additional factors for the lack of significant damage in mosquito cells and the establishment of persistent infections.

Results

Bunyamwera virus dramatically and transiently transforms the morphology of mosquito cells in culture

When infected with BUNV, C6/36 mosquito cells derived from *A. albopictus* go through three different stages that involve significant changes in cell shape (Fig. 1). The Gc glycoprotein and the NC protein of the virus that at early times post infection exhibit the characteristic membrane-associated and cytosolic patterns, respectively, later followed very different pathways as observed by confocal microscopy. The earliest pattern for Gc distribution was observed at 8–10 h p.i. and consisted in perinuclear dots that colocalized with Golgi-specific markers (see below) while NC protein was typically cytosolic (Fig. 1A and D). At this stage Gc and NC colocalized in discrete spots (not shown). During this early phase cells were mostly round shaped. However, at 15 h p.i. very long projections were seen on the surface of infected cells while both Gc- and NC-associated signals became more intense (Fig. 1B and E). Gc strongly associated to these projections while NC protein was localized only in some stretches of them. The number of cell surface projections reached a maximum at about 25 h p.i. and a progressive decrease in those numbers was detected at 36 h and later. At 82, 97 and 155 h p.i. cells had recovered their characteristic round shape and Gc is back in perinuclear dots (Figs 1C and S1). However, the viral NC protein followed a very different pathway. The strong cytosolic signal, characteristic of many other viral nucleoproteins, was followed by a progressive concentration of NC in large juxtanuclear structures that we have named 'N-bodies' (Fig. 1F). This effect was first observed in some cells at 36 h p.i. but later affected the whole monolayer. Coalescence of several N-bodies created a single structure per cell later in infection. Among the times post infection analysed in this study, the mentioned effect was first detected at 57 h p.i. This happened simultaneously to the disappearance of the long membrane projections. Unlike Gc, NC did not revert with time to the initial cytosolic pattern: the N-body became smaller and progressively disappeared from at

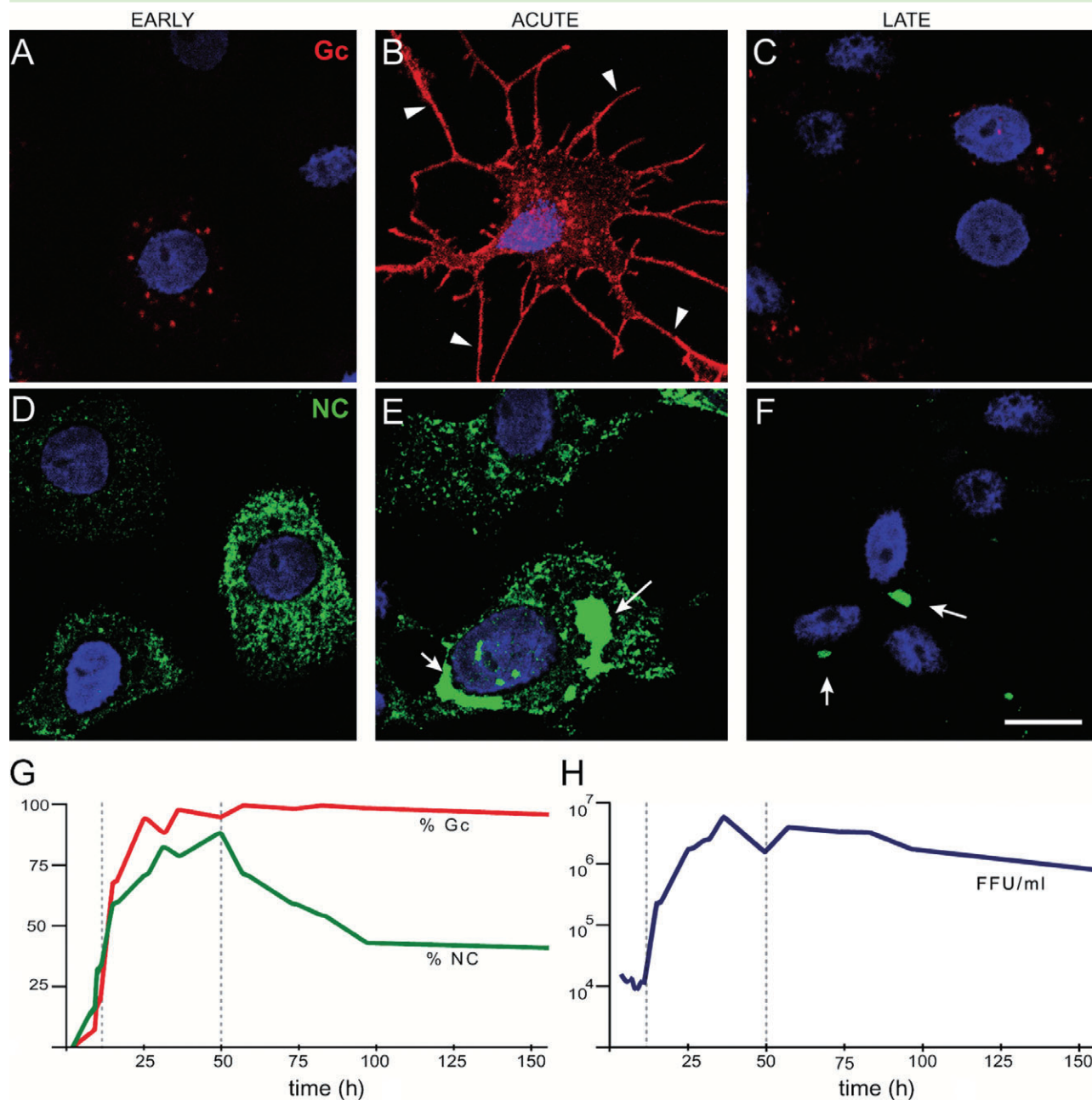


Fig. 1. Time-course of BUNV infection in C6/36 mosquito cells. Cells infected at 1 FFU per cell were processed for detection of Gc and NC viral proteins by immunofluorescence and confocal microscopy and quantification of infectious viruses released into the culture medium at the indicated times post infection.

A–F. Compiled Z stacks of confocal images show changes in the distribution of Gc (red) and NC (green) proteins for the three main stages of BUNV infection: early, acute and late. Nuclei are stained in blue. (A) and (D) show cells at 10 h p.i., (B) and (E) are cells at 15 h p.i., and (C) and (F) correspond to cells at 155 h p.i. Gc starts in perinuclear dots (A) and later delineates long membrane elongations (B, white arrowheads) to recover the initial stage at long post-infection times (C). NC protein shows an early cytosolic distribution (D) and is progressively sequestered into large perinuclear structures that become smaller with time (E and F white arrows).

G. Percentage of cells positive for Gc (red) or NC (green) (y-axis) at different times post infection (x-axis).

H. Growth curve of BUNV in C6/36 cells. Viral titre (y-axis) was calculated as fluorescent forming units per millilitre (FFU ml⁻¹). The acute phase of infection is represented between grey dashed lines in (G) and (H). Bar, 20 µm.

least half of the cells as shown at 155 h p.i. (Fig. S1). Quantification of the amount of cells positive for Gc or NC is shown in Fig. 1G. Dashed lines mark the limits of the acute phase of infection (from 12 to 50 h p.i.) characterized also by the maximum release of infectious viruses as measured by titration assays of the supernatants (Fig. 1H).

Long projections with microtubules connect cells during the acute phase

Cells were grown on gridded glass bottom dishes for tracking individual cells in control and infected cultures (Fig. 2). Control and infected cells from 20 different marked areas were counted at 0, 1, 9, 11, 13, 15, 17, 19 and 24 h, and no significant differences in their division rates were detected. Figure 2A and B shows a group of non-infected cells in a particular position (AM) at 0 and 24 h while Fig. 2C and D shows infected cells (position 6Q) from 0 h to 24 h p.i. Infected cells have established new contacts (arrows in Fig. 2D). Measurement of the number of intercellular contacts in both non-infected and infected cultures showed a significant increase of those in infected cells (Fig. 2E). Higher magnification phase-contrast and differential interference contrast (DIC) images showed that these intercellular contacts were mediated by long filopodia-like protrusions (Fig. 2F–I). Interestingly, at 8 h p.i. some cells have already acquired a 'star shape' and are contacting surrounding cells before synthesis of viral protein can be detected by immunofluorescence (see below). Lateral merged images of control and infected cultures showed that cells get very flat during the transition from round to star shape (Fig. S2). Microtubules were detected inside the long projections to later retract at the end of the acute phase when cells get together in groups at the same time they 'encapsulate' NC in the juxtanuclear structure (Fig. 2J–O).

Viral proteins and cell organelles inside intercellular bridges

Long projections developed by BUNV-infected mosquito cells that lead to new intercellular connections are only present during the acute phase of infection, which suggests they must play some kind of role during that early phase. Steady images provided by DIC and confocal microscopy showed two main types of projections: thicker structures (up to ~800 nm) or more rigid and thinner (~50–200 nm). A detailed confocal microscopy study has shown the presence of both viral and cell components in the cell projections (Fig. 3). Viral Gc and NC were detected in the long filopodia-like protrusions where they colocalized in very discreet spots only (Fig. 3A–C). However, the viral RNA polymerase (L) and

NC travel together possibly as viral ribonucleoproteins (RNPs) according to the observed colocalization patterns (Fig. 3D–F). In addition to its presence in plasma membrane the viral glycoprotein Gc was detected inside the projections where it colocalized with the Golgi marker GM130 (Fig. 3G–I). Lysosomes and mitochondria were also detected inside the thickest long projections (Fig. 3J–O). Electron microscopy of infected cells processed by oriented sectioning showed mitochondria and membranous organelles, but the most frequent element detected inside the long projections consisted in stacked membranes that remind Golgi sacculi (Fig. 3P and Q).

To better understand the mechanism of formation of virus-induced cell surface projections we have studied infection by live cell microscopy. We have taken advantage of a fluorescent recombinant BUNV that has EGFP fused to the non-structural protein NSm (Fig. 4, Movies S1 and S2). NSm is involved in morphogenesis and its behaviour in infected mosquito cells is similar to that described for the viral structural proteins (Fig. S3). When compared with wild-type virus the rBUNM-NSm-EGFP virus grows and propagates more slowly in mosquito cells. This has helped us to visualize the movement of cell projections containing NSm-EGFP towards neighbouring cells, something difficult to catch in cells infected with WT BUNV where cells projections develop very fast. Interestingly, cell projections were already present in non-labelled cells (Fig. 4A–C). Filopodia-like protrusions in fluorescent cells moved fast tracing pathways that insistently contacted non-fluorescent cells (Fig. 4D–G, Movie S1). However, although some transfer of fluorescent material was observed (Fig. 4F and G, Movie S1) contacted non-fluorescent cells remained non-fluorescent after several hours (up to 15 h) (Fig. 4H–K, Movie S2). Video microscopy also showed that cells first emit thicker projections where NSm-EGFP apparently moved randomly in 'pulses' or 'waves'. After contacting another cell the projection became much thinner (Movie S1). NSm-EGFP was mainly detected inside thicker bridges. Cells finally get together with fluorescent and non-fluorescent cells sometimes in different, separate groups (Movie S2).

Viral factories and assembly compartment of BUNV in mosquito cells

A detailed microscopy analysis was developed to characterize the viral factories built by BUNV in mosquito cells. We have studied more than 5000 infected C6/36 cells in oriented thin-sections visualized by electron microscopy. Oriented serial sectioning is a technique that allows an accurate analysis of eukaryotic cells without missing scarce elements or non-randomly distributed intracellular structures (Fontana *et al.*, 2008). As observed by confocal

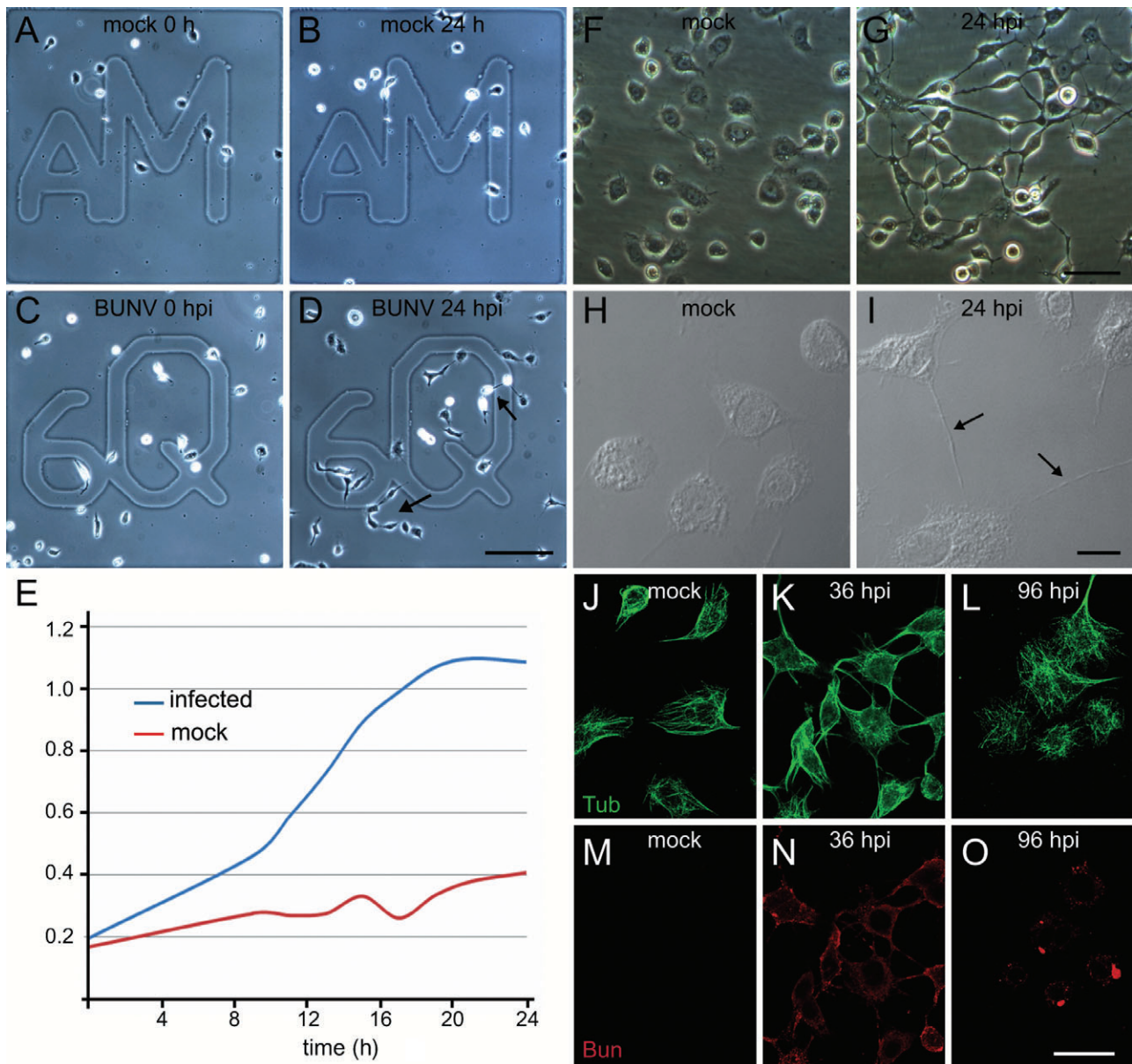


Fig. 2. BUNV-infected cells emit projections that lead to new cell-to-cell contacts. Groups of live C6/36 cells grown on gridded plates were mock- (A and B) or BUNV-infected (C and D) and studied by phase-contrast light microscopy from 0 to 24 h. Infected cells show new intercellular contacts (black arrows in D).

E. Quantification of intercellular contacts (y-axis) done as described in *Experimental procedures* throughout 24 h (x-axis).

F and G. Higher magnification images of control (F) and infected (G) cells showing changes in shape and new intercellular connections in the later.

H and I. DIC microscopy showing fine details of control (H) and infected (I) C6/36 cells that become flat and develop long projections (arrows) during the acute phase of infection.

J–O. Z-series projections of single optical sections of confocal images showing tubulin reorganization (green) in infected cells labelled with anti-BUNV (red) at different times post infection. Bar: A–D, 250 μ m; F and G, 50 μ m; H and I, 10 μ m; J–O, 30 μ m.

microscopy, the Golgi complex of C6/36 mosquito cells is constituted by many individual stacks distributed in the perinuclear region (Fig. 5), a feature characteristic of larval insect cells (Kondylis *et al.*, 2001). The Golgi marker GM130 exhibits a pattern of perinuclear dots that was maintained during the acute phase of infection (Fig. 5A

and B). Electron microscopy shows the ultrastructure of the Golgi stacks (Fig. 5C). In infected cells the Golgi marker and the viral Gc protein colocalize (Fig. 5D). When sectioned through the cell body the ultrastructure of control and infected cells were very similar as seen by electron microscopy (Fig. 5E and F). The only significant

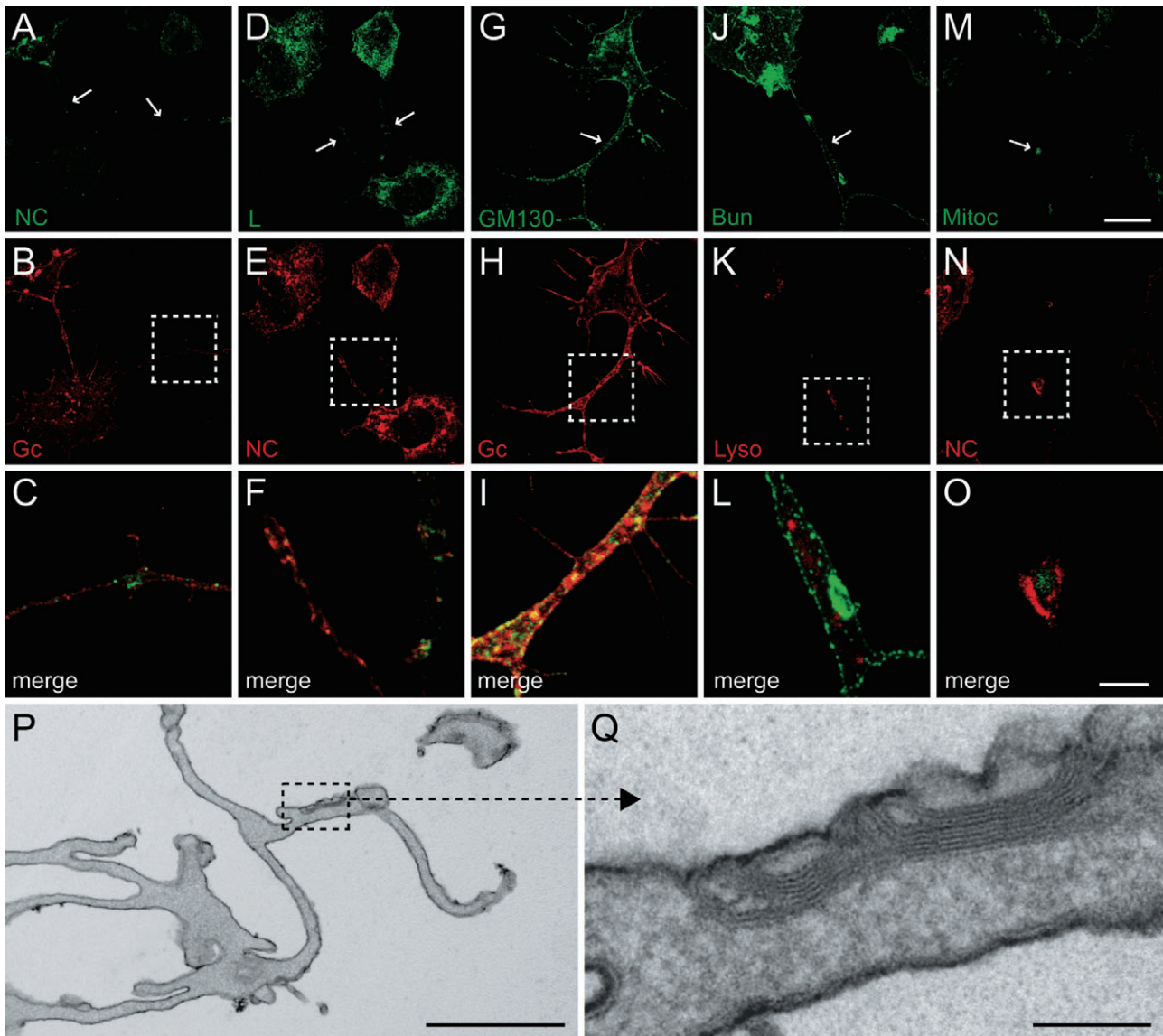


Fig. 3. Viral proteins and cell organelles inside filopodial-like bridges.

A–O. Compiled Z stacks of confocal images after immunolabelling with antibodies against different viral components (NC, L, Gc and BUNV) and Golgi (GM130 Golgi marker) Mitochondria and lysosomes were labelled with the fluorescent probes for live cells Mitotracker and LysoTracker respectively. Both viral proteins and cell organelles are detected in the long projections that connect cells (white arrows). For colocalization studies single optical sections are shown in the panels on the bottom (C, F, I, L and O) that are higher magnification views of the areas marked with white dashed squares.

P and Q. Electron microscopy of a membranous projection as seen by oriented sectioning. These filopodial-like bridges are branched (mainfield) and frequently contain stacked membranes inside (Q).

Bar: A, B, D, E, G, H, J, K, M and N, 15 μ m; C, F, I, L and O, 4 μ m; P, 1 μ m; Q, 100 nm.

change detected in infected cells was the presence of smaller and darker mitochondria (Fig. 5F). Instead of the large perinuclear factory built by BUNV in mammalian cells (Fontana *et al.*, 2008), in mosquito cells the virus assembles mini-factories constituted by one Golgi stack with viruses surrounded by mitochondria, RER and large vacuoles (Fig. 5G).

Electron microscopy revealed important differences in the integrity of the Golgi complex from infected mosquito

and mammalian cells (Fig. 6). In BUNV-infected BHK-21 mammalian cells the virus assembles by budding in Golgi membranes and viral particles accumulate in the lumen of swollen Golgi stacks (Fig. 6A and B). However, in mosquito cells BUNV assembles in peripheral Golgi stacks and no accumulation of viral particles in the lumen of Golgi is observed (Fig. 6C and D). Extracellular virions with a mature layer of spikes looked like those released by mammalian cells (Fig. 6C, inset). However, virions on the

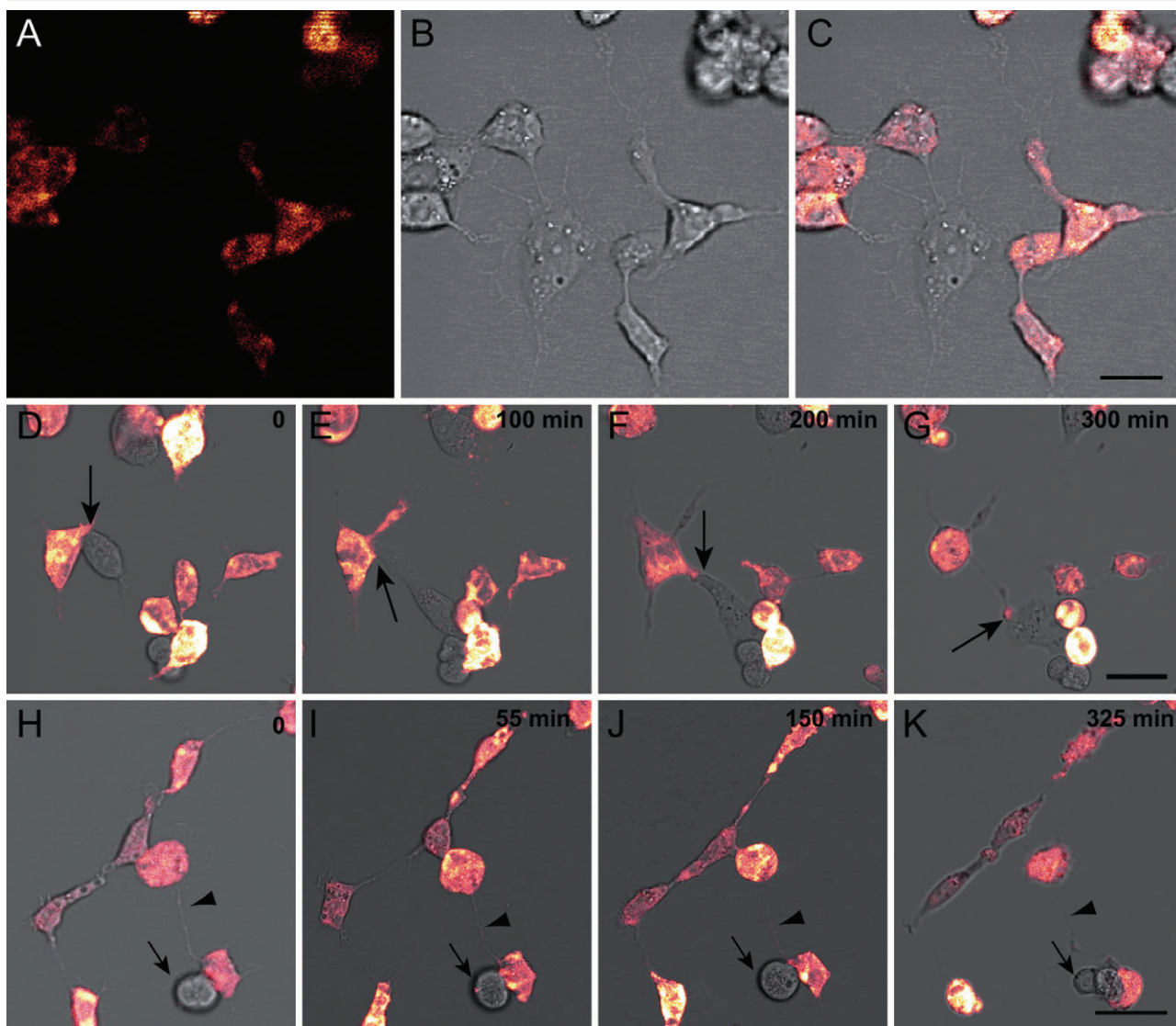


Fig. 4. Infection of C6/36 cells with the recombinant virus rBUNM-NSm-EGFP. Cell monolayers were infected with the rBUNM-NSm-EGFP fluorescent recombinant virus at an moi of 1 FFU per cell and images from live cells were collected at different times post infection. EGFP fluorescent signal has been switched to 'glow false colour' with LAS AF software for better visualization. A–C. Fluorescent cells surrounding and contacting a non-fluorescent cell that already exhibits star-shape morphology. (A) Shows the fluorescent signal, (B) corresponds to DIC and (C) is the merge. Several infected cells are contacting the star-shaped, non-fluorescent cell that remains non-fluorescent 15 h later. D–G. Fluorescent cells contacting non-fluorescent cells (black arrow at 0 min in D). A 'thick bridge' has been formed between these cells at 100 and 200 min (black arrows in E and F). This filopodium-like protrusion later transforms into a much thinner connection (G). Although some transfer of fluorescent material is observed (black arrow in G) the group of non-fluorescent cells remain non-fluorescent 15 h later (at 35 h p.i.; see Movie S1). H–K. Still images from a different video showing a non-fluorescent cell (arrow) attached to a fluorescent cell but remaining non-fluorescent. Arrowhead points to one of the filopodial-like bridges formed in the group of cells. Bar, 25 μ m.

Fig. 5. Mini-viral factories assemble in mosquito cells during the acute phase in of infection.

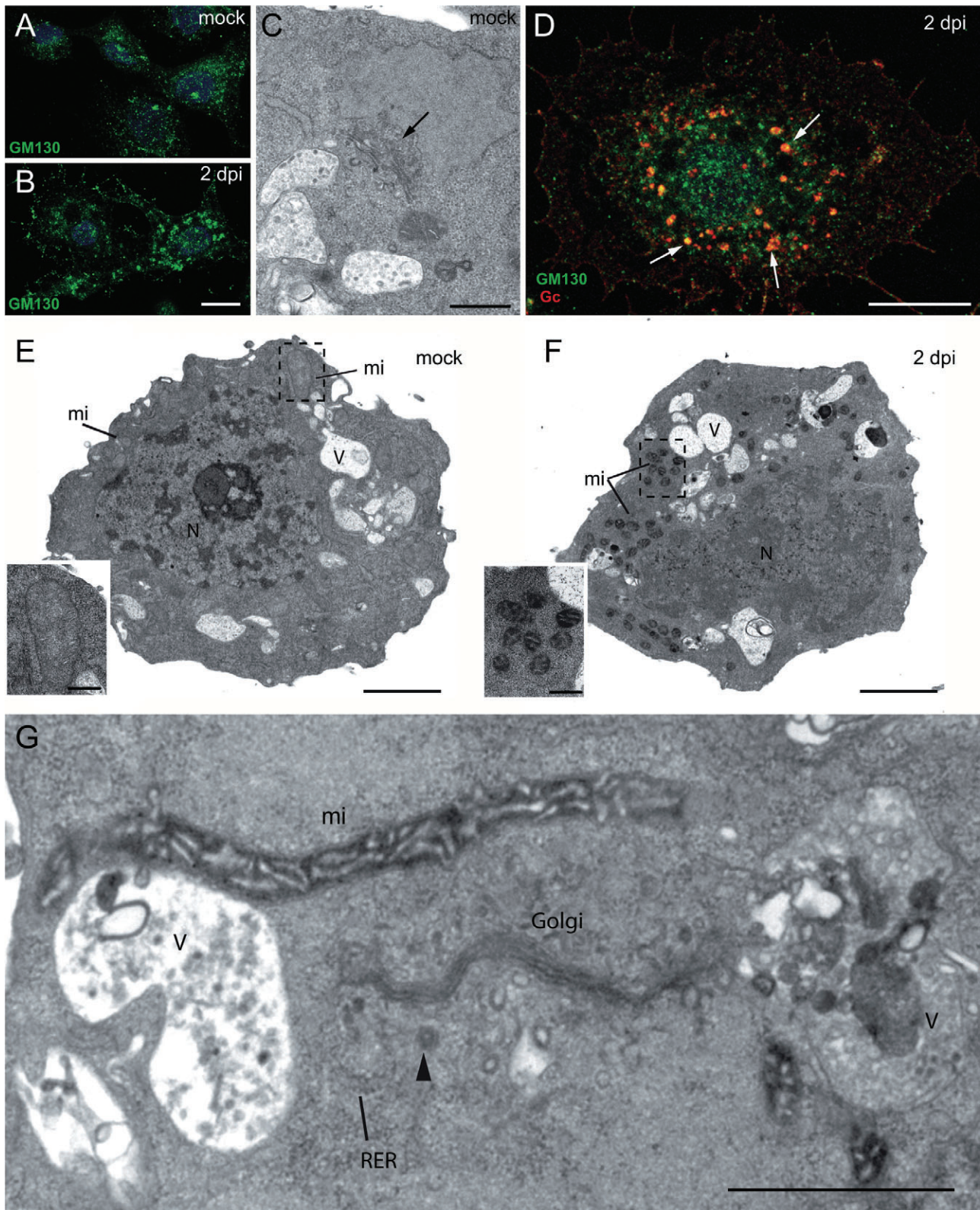
A and B. Golgi complex in control and infected cells (at 2 days p.i. or dpi), respectively, as seen by immunolabelling of the Golgi marker GM130 and confocal microscopy (Z-series projections of single optical sections are shown).

C. Electron microscopy showing the structure of the Golgi complex that forms small stacks (arrow) in non-infected C6/36 cells.

D. Colocalization of Gc viral protein (red) and Golgi (green) suggests the formation of many small viral factories (white arrows) in infected cells.

E and F. Electron microscopy of the cell body of a control and an infected cell respectively. Insets are enlargements of the areas marked with dashed rectangles and show the structure of mitochondria.

G. Ultrastructure of a mini-viral factory with a Golgi stack surrounded by organelles. Arrowhead points to a viral particle. V, vacuole; mi, mitochondria; RER, rough endoplasmic reticulum. Bar: A, B and D, 10 μ m; C and insets in E and F, 0.5 μ m; E and F, 2 μ m; G, 1 μ m.



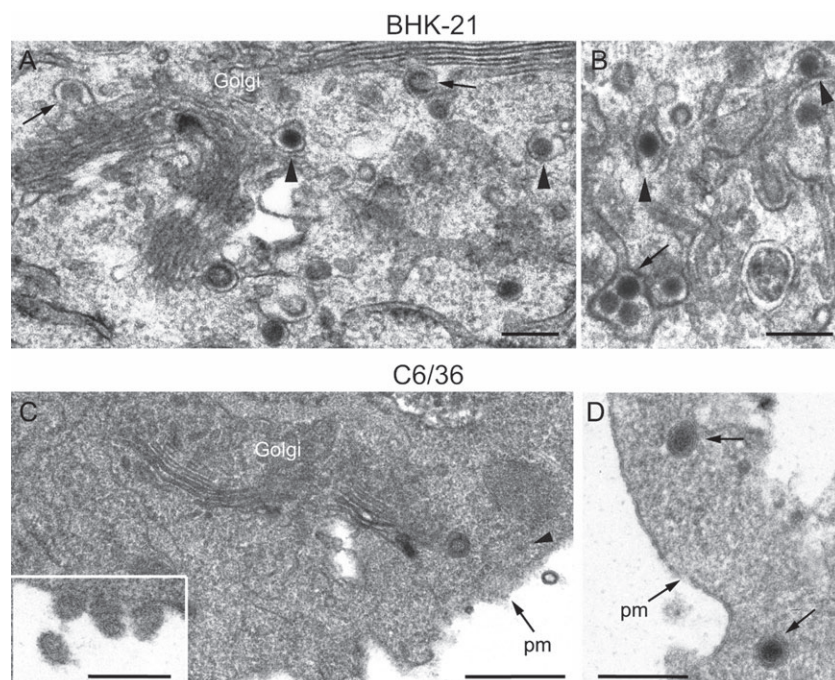


Fig. 6. BUNV assembly compartment in mammalian and mosquito cells. Electron microscopy of BUNV-infected BHK-21 mammalian cells (A and B) and BUNV-infected C6/36 mosquito cells (C and D).

A and B. BUNV budding profiles in Golgi membranes (black arrows in A) and viral particles in the lumen of swollen Golgi stacks (arrowheads in A and B). Arrow in (B) points to a group of viruses in the *trans*-Golgi network.

C. Peripheral Golgi stack with a viral particle (arrowhead) in a BUNV-infected mosquito cell. The inset in (C) shows a group of released extracellular viruses attached to the cell surface.

D. Electron micrograph showing two dense intracellular viruses free in the cytosol near the plasma membrane. Pm, plasma membrane. Bars, 200 nm.

surface of C6/36 mosquito cells were apparently more deformable.

The content of the N-body in persistently infected cells

The end of the acute phase of infection was characterized by the formation of the N-bodies. These are large accumulations of viral NC protein that coalesce into a single juxtanuclear structure (Figs 1E and 7). Confocal microscopy showed that N-bodies can be quite big (Figs 1E and 7A) and exhibit a considerable density as appreciated by DIC microscopy (Fig. 7B). Immunofluorescence colocalization studies revealed that the viral

polymerase (L) was also targeted to the N-bodies (Fig. 6C–E). However, the non-structural NSm viral protein was not detected in these structures (Fig. S3). Immunoelectron microscopy showed that NC protein is not homogeneously distributed inside the N-body but concentrated in domains (Fig. 7F and G). A detailed ultrastructural study showed that the N-body is surrounded by mitochondria, RER, vacuoles and Golgi stacks (Fig. 7H). No clear boundaries were seen on the periphery of the N-body but the accumulation of RER cisternae was remarkable (Fig. 7I). The interior of the N-body was surprisingly 'empty' of well-defined elements, with some granules that reminded ribosomes

Fig. 7. The N-body near the nucleus late in infection.

A. Confocal microscopy of infected cells showing two N-bodies (green) of different size near the nucleus (blue). Viral Gc glycoprotein is labelled in red.

B. DIC microscopy shows that the N-bodies have a considerable density (arrowheads).

C–E. Confocal analysis of infected cells (single optical sections) showing colocalization of viral NC (red) and L (green) proteins in smaller and larger N-bodies (merge in yellow). Cells were infected with the recombinant virus rBUNV-L4V5 and detection of L was done with antibodies specific for the V5 epitope.

F. Immunogold labelling of viral NC protein and electron microscopy of an N-body. Some regions inside the N-body are heavily labelled and coexist with areas of lower electron-density and no labelling (asterisk).

G. Higher magnification images of selected areas (dashed rectangles) are shown in (G) where two labelled extracellular viruses are shown on the top (arrows) and labelling inside the N-body can be seen on the bottom.

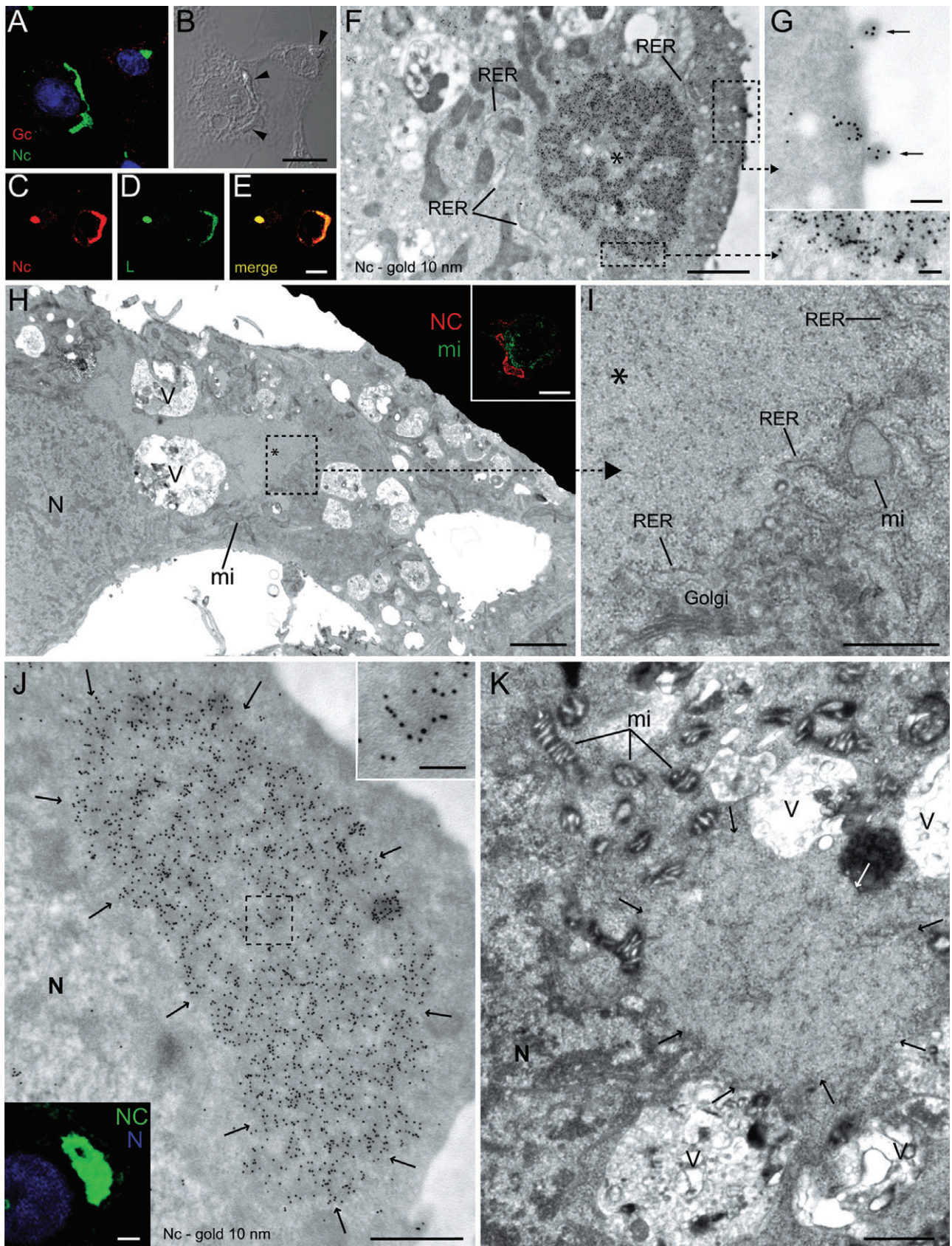
H. Ultrastructure of a cell with a large N-body. Low magnification field shows that the N-body contains a material of low density (asterisk) surrounded by large vacuoles (V) and mitochondria (mi). Confocal microscopy also reveals mitochondria closely apposed to the N-body (inset).

I. High magnification view of the area marked with a dashed rectangle in (H) showing details of the granular content of the N-body (asterisk) and the interface with surrounding organelles where RER elements accumulate.

J. Immunogold labelled large N-body showing linearly arranged NC-associated gold particles. The inset on the top is an enlargement of the area marked with the dashed square in the mainfield, while the inset on the bottom is a confocal image of a similar N-body for correlation.

K. Thin section showing the ultrastructure of an N-body totally surrounded by mitochondria and large vacuoles. The arrows mark the periphery of the N-body. RER, rough endoplasmic reticulum; G, Golgi; N, nucleus; mi, mitochondria.

Bar: A–E 10 µm; F, 1 µm; G and inset (EM image) in J, 100 nm; H and inset (confocal image) in J, 2 µm; I–K, 0.5 µm.



(Fig. 7I). Immunogold labelling frequently showed linearly arranged gold particles suggesting an association of NC with filaments or membranes (Fig. 7J). Numerous mitochondria and large vacuoles often surround the periphery of the N-bodies (Fig. 7K).

Discussion

When a virus infects a cell the subsequent steps in its replication cycle involve interactions between different types of viral components and much more complex pools of host factors. In the case of arboviruses the identification of interactions that lead to cell death in mammalian cells and persistence and survival in mosquito cells will be of extreme importance not only to understand the bases of arbovirus cytopathogenicity but to identify new ways to interfere with cell damage and death caused by pathogenic RNA viruses. We are just starting to understand the high complexity of the interactions between arboviruses and their arthropod vectors (Fragkoudis *et al.*, 2009; Vasiliakis *et al.*, 2009).

Our results with BUNV in mosquito cells can contribute to understand how these cells are able to maintain infection under control. First of all, during the acute phase of infection cells become highly mobile, produce many infectious viruses and develop long surface projections that 'seek' for surrounding cells, something that we have never observed in BUNV-infected mammalian cells. Although many new intercellular contacts are created these do not seem to contribute significantly to the propagation of infectious viruses. Second, the described acute reaction is accompanied by the beginning of a massive recruitment of essential viral proteins into aggregates that coalesce to form a large juxta-nuclear complex. At that moment cells have clearly defeated the virus and enter into persistence. But before that happens, cells have already released a high amount of new infectious viruses without an irreversible damage in their system of endomembranes.

In mammalian cells viral particles bud in association with membranes of the Golgi apparatus (Matsuoka *et al.*, 1994; Novoa *et al.*, 2005a,b; Shi *et al.*, 2005; Fontana *et al.*, 2008) and accumulate in the lumen of this organelle (Fig. 6A and B). Viral particles are subsequently released to the extracellular medium from secretory vesicles. The accumulation of viruses in Golgi stacks causes a significant swelling and fragmentation of the organelle together with a significant disruption of the secretory pathway, as previously documented (Salanueva *et al.*, 2003). However, Golgi ultrastructure in bunyavirus-infected mosquito cells does not show any appreciable change when compared with Golgi stacks from control, non-infected mosquito C6/36 cells. Although C6/36 cells have a functional secretory pathway

used by other viruses (Hase *et al.*, 1987), we show here that in C6/36 cells BUNV assembly is restricted to peripheral Golgi stacks and viral particles probably exit the cell immediately since they do not accumulate intracellularly. Thus, viral morphogenesis in mosquito cells must be less disturbing for cell endomembranes, something that could be of particular importance during the acute phase of infection, before cells trigger defence signals that lead to persistence. Also *in vivo* since it has been reported that in persistently infected mosquitoes replication of La Crosse (LAC) bunyavirus depends on host cell biosynthetic status and increases with feeding (Chandler *et al.*, 1996).

In our infected cultures mosquito cells develop numerous membranous bridges that contact surrounding non-infected neighbours. The new intercellular bridges could play an important role early in infection. Cells use a variety of intercellular structures for cell-cell communication including gap junctions, synapses, cytonemes or filopodial bridges and tunnelling nanotubes (Scherer and Mothes, 2008). Tunnelling nanotubes are tubular conduits between cells that provide for the exchange of both cell surface molecules and cytoplasmic content. By contrast, bridges that do not connect cytoplasm but that still enable the transport of ligands across the outer surface are referred to as cytonemes or filopodial bridges. Cytonemes were first observed in the imaginal disc of flies and described to serve for long distance transport of morphogens (Ramírez-Weber and Kornberg, 1999). F-actin is readily detected within membrane nanotubes while the presence of microtubules varies. Vesicles could traffic inside thick nanotubes in a microtubule-dependent manner, whereas cargo could traffic via the constitutive flow of the surface of thin nanotubes.

Within this context the projections we have detected on the surface of BUNV-infected mosquito cells are heterogeneous and change with time as revealed by live cell imaging. They are initiated by infected cells as pulses or waves that form thick bridges towards neighbouring cells and once the contact is established the intercellular bridges usually change to thinner and more rigid structures. The thicker structures contain microtubules, mitochondria, Golgi membranes and lysosomes and movements of the viral protein NSm-GFP along these projections are frequently seen. However, these movements are not unidirectional and do not end up with an evident incorporation of the fluorescent signal into non-infected cells. This result suggests that under the conditions of our experiments the enhanced mobility of infected cells around non-infected cells and the creation of new intercellular contacts has not produced a massive exchange of cytosol or enhanced the propagation of infection. Alternatively, cell surface

projections could be used by infected mosquito cells to propagate an antiviral signal. It is known that although viruses can manipulate filopodia for the purpose of viral spread cells can also use these connections for transmitting signals of defence against pathogens. This has been recently reported in *A. albopictus*-derived U4.4 mosquito cells where small interfering RNA (siRNA) can move between cells that are in contact (Attarzadeh-Yazdi *et al.*, 2009). At early times post infection some mosquito cells in our cultures have already acquired the star-shaped morphology and created new intercellular contacts before viral protein can be detected by immunofluorescence. Thus, the stimulus that triggers the development of the intercellular bridges must be serving a purpose unrelated to the propagation of new viral particles. Moreover, later in infection we have not been able to see viral particles inside the intercellular bridges or surfing on their surface. However, we still cannot discard the presence of viruses or RNPs in the filopodial bridges, as suggested by the colocalization of viral NC and L proteins in these structures. The 'antiviral signal' would not be protecting cells from becoming infected under the conditions of our experiments since 100% cells are actually infected at 49–57 h p.i. when using a multiplicity of infection (moi) of 1 fluorescent focus unit (FFU) per cell. We think that the hypothetical antiviral signal transmitted by recently infected cells towards surrounding non-infected cells could somehow prepare them to receive infectious viruses. This protective signal could trigger the expression of the cell factor(s) encharged of the massive removal of NC and L proteins from active viral RCs and assembly sites to the large cytoplasmic aggregates or 'N-bodies'. Studies at lower moi hopefully will help us to test this hypothesis and to know if full protection against infection can be acquired.

The relatively efficient control of arbovirus infection in mosquitoes is very likely to be due to innate immune responses (Fragkoudis *et al.*, 2009). Although arthropods do not have the powerful interferon response of vertebrates several studies suggest that antimicrobial immune pathways such as Toll, JAK/STAT and Imd/Jnk are induced in arbovirus-infected mosquitoes. In addition, siRNA-mediated RNAi is an important antiviral mechanism in mosquitoes (Keene *et al.*, 2004). On the cell side it has been also suggested that sequestration of the alphavirus replication complexes into membrane vesicles protects from RNAi (Sanchez-Vargas *et al.*, 2009). Whatever the stimulus that provokes the entry into a persistent infection, we have observed that in BUNV-infected cells the process is characterized by a massive trapping of viral NC and L proteins into large perinuclear complexes. This trapping of essential proteins for viral replication and assembly is probably protecting cells from

the deleterious effects of infection that leads to death in mammalian cells. Curiously, the encapsulation of NC in mosquito cells exhibits important morphological similarities with the described aggregation of NC by the interferon-induced MxA protein in mammalian cells (Kochs *et al.*, 2002). Mx proteins are key components of the antiviral state induced by interferons in many species. They belong to the class of dynamin-like large guanosine triphosphatases (GTPases) known to be involved in intracellular vesicle trafficking and organelle homeostasis. MxA functions as a potent antiviral protein both *in vitro* and *in vivo* (Miura *et al.*, 2001; Haller and Kochs, 2002; Holzinger *et al.*, 2007). Its antiviral activity appears to be based on detecting viral infection by sensing NC-like structures, such as pre-formed or forming NCs or at early steps of viral RNA transcription, such as uncoating. In the case of bunyaviruses, MxA recognizes the viral NC protein and interferes with its role in viral genome replication. As a consequence, essential viral components are trapped and sorted to locations where they become unavailable for the generation of new viral particles. Although insect cells do not have the interferon response it has been reported that *Drosophila melanogaster* contains multiple tissue-specific and developmentally regulated forms of dynamin, which are products of the shibire locus previously implicated in endocytic protein sorting (Chen *et al.*, 1991; González-Bellido *et al.*, 2009). The *shibire* gene encodes a protein that is highly similar to rat dynamin; 69% of the aminoacid sequence is identical. Dynamin is a GTP-driven mechanochemical enzyme related to mammalian Mx-proteins, involved in interferon-induced viral resistance, and to the yeast *vps1* gene product, which has been implicated in membrane protein sorting and in meiotic spindle pole separation. The N-terminal region of rat brain dynamin contains the three consensus elements characteristic of GTP-binding proteins, and extensive homology was found between this domain and the mammalian Mx proteins.

In our future work we will study if dynamin-like proteins are responsible for blocking infection in mosquito cells and if signalling mediated by these proteins is transmitted through the new intercellular bridges built early in infection. Although the intercellular connections could be serving both to the virus for propagating infectious material and to the cells for sending a protective warning, it is clear that mosquito cells win the battle when entering persistence. Interestingly, this is only temporary since the acute phase of infection is repeated when persistently infected mosquito cells are submitted to serial passage in culture (Scallan and Elliott, 1992). Identification of virus and host factors responsible for these cycles could be of great importance in the fight against arboviruses.

Experimental procedures

Cells and viruses

The cell line from *A. albopictus*, clone C6/36 supplied by the American Type Culture Collection (ATCC CRL-1660), was grown in L-15 medium supplemented with 10% tryptose phosphate broth (Gibco/Invitrogen) and with 10% fetal calf serum from Reactiva SA (Barcelona, Spain). BHK-21 cells (ATCC C13) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum. Bunyamwera virus or BUNV (ATCC BR-87) was propagated in C6/36 cells as previously described for BHK-21 cells (Salanueva *et al.*, 2003; Novoa *et al.*, 2005b). Titre determination was done in C6/36 cells by indirect immunofluorescent assay according to described procedures (Payne *et al.*, 2006) with modifications. An anti-BUNV polyclonal antibody was used for immunolabelling followed by counting fluorescent plaques, in an analogue way as the lysis-plaque-forming assay previously described for mammalian cell lines (Salanueva *et al.*, 2003). BUNV expressing EGFP-tagged NSm, rBUNM-NSm-EGFP and BUNV expressing V5 epitope-tagged L protein designated as rBUNV-L4V5 generated by reverse genetics as described (Shi *et al.*, 2006; Shi and Elliott, 2009) were kindly provided by Dr Richard M. Elliott (Centre for Biomolecular Sciences, University of St Andrews, UK).

Antibodies

The antiserum against the extracellular form of BUNV and the MAb742 monoclonal antibody against BUNV Gc glycoprotein were described previously (Watret *et al.*, 1985; Lappin *et al.*, 1994; Weber *et al.*, 2001) were kindly provided by Dr Richard M. Elliott (Centre for Biomolecular Sciences, University of St Andrews, UK). Rabbit anti-NC antiserum was obtained by immunization with a synthetic peptide corresponding to the amino terminal region of the protein as described (Fontana *et al.*, 2008). Three antibodies specific for the Golgi complex (Kondylis *et al.*, 2001) were used to label this organelle in mosquito cells: MLO7 anti-GM130 and NN7 anti-p115 rabbit antisera were kindly provided by Dr Martin Lowe (Faculty of Life Sciences, University of Manchester, UK) and the anti-AP3 rabbit antiserum was a kind gift of Dr Margaret Robinson (Cambridge Institute for Medical Research, UK). The MLO7 anti-GM130 antibody used in our study has been previously characterized in detail by Western blot and immunofluorescence (Nakamura *et al.*, 1995; Lowe *et al.*, 1998; Kondylis *et al.*, 2001). Immunofluorescence with this antibody reveals a characteristic perinuclear ribbon in HeLa mammalian cells (Nakamura *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 2005), while in larval insect cells this antibody labels discreet dots corresponding to small Golgi stacks (Kondylis *et al.*, 2001). The mouse anti-V5 antibody was from AbD Serotec. The anti- β tubulin monoclonal antibody (T-4026) was purchased from Sigma-Aldrich. Fluorescent secondary antibodies (Alexa 488 nm and 594 nm), Topro (marker for nuclei), MitoTracker Green FM (probe for mitochondria) and LysoTracker Red DND-99 (probe for Lysosomes) were purchased from Molecular Probes/Invitrogen. Another marker for nuclei, Dapi, was obtained from Sigma-Aldrich. The goat anti-rabbit secondary antibody conjugated with 10 nm colloidal gold was from BB International.

Infections

Monolayers of C6/36 cells were infected with wild-type BUNV, recombinant virus rBUNV-NSm-EGFP or recombinant virus rBUNV-L-V5 at an moi of 1 FFU per cell. At different times post infection, culture supernatants were collected for elaborating viral growth curves and cell monolayers were studied by light microscopy (bright field, phase-contrast or DIC). Alternatively, cell monolayers were processed for immunofluorescence and confocal microscopy or electron microscopy. Monolayers of BHK-21 cells were infected at an moi of 1 plaque forming unit per cell and at 10 h p.i. cells were processed for thin-sectioning and electron microscopy as described (Novoa *et al.*, 2005b).

Light microscopy

Cell monolayers grown on glass coverslips were fixed and processed for immunolabelling of viral and cellular components as previously described (Novoa *et al.*, 2005b; Fontana *et al.*, 2007). Images were collected in a Leica DFC300 FX, a Zeiss Axiovert 40 CFL or a Leica DMRXA epifluorescence microscopes. For confocal microscopy we used a Bio-Rad Radiance 2100 laser scanning system mounted on a Zeiss Axiovert 200 confocal microscope and a Leica TCS SP5 spectral confocal. For quantifying the number of intercellular contacts, mock- and BUNV-infected C6/36 cells were grown on gridded glass bottom dishes (P35G-2-14-CGRD) from MatTek. Phase-contrast images corresponding to 20 different numbered squares were collected from control and infected cells at 0, 1, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 and 24 h p.i. and the number of cells and contacts between them were counted. The number of contacts between cells was divided by half the number of cells since 'two' is the minimum number of cells required for one intercellular contact.

For video-microscopy of live cells C6/36 cells were grown on glass bottom culture dishes (P35G-1.5-20-C) from MatTek. At 20 h p.i. with the fluorescent virus rBUNV-NSm-EGFP fluorescence and DIC images were collected every 5 min.

Transmission electron microscopy

Fixation, dehydration and embedding procedures were done as previously described (Risco *et al.*, 2002; Fontana *et al.*, 2008). The epoxy-resin EML-812 for ultrastructural studies and Lowicryl K4M acrylic resin for immunogold labelling were provided by Taab Laboratories (Adernaston, Berkshire, UK). For oriented sectioning cells were grown on Thermanox plastic flat pieces purchased from Nunc (Rochester, NY, USA). Cells infected with BUNV were fixed and embedded in the epoxy resin EML-812 as described (Fontana *et al.*, 2008) using a flat embedding mould (Ted Pella). Monolayers were oriented to obtain sections in planes parallel to the cell base. Ultrathin (50–70 nm) sections were obtained in a Leica EM UC6 ultramicrotome, collected on Formvar/carbon-coated copper or gold grids and either stained with uranyl acetate and lead citrate or processed for immunogold labelling as described (Salanueva *et al.*, 2003). In brief, after a 30 min incubation with Tris buffer-gelatin (TBG, 30 mM Tris-HCl, pH 8.0, with 150 mM NaCl, 0.1% bovine serum albumin and 1% gelatin) sections were floated for 1 h on a drop of the rabbit antiserum specific for the Nt-domain of NC protein diluted 1:200 in TBG. After washing, sections were incubated 1 h with a goat

anti-rabbit secondary antibody conjugated with 10 nm colloidal gold particles. Grids were allowed to dry before staining with a solution of saturated uranyl acetate. Samples were studied in a Jeol JEM 1011 electron microscope operating at 100 kV.

Image processing

Digital photographic editing was done employing the following software packages: Adobe Photoshop CS (Adobe Systems), Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), Laser Sharp 200 (Bio-Rad), LAS and CW4000 FISH (Leica Microsystems). Videos from live cell microscopy imaging were done by combining sequential images using LAS AF software.

Acknowledgements

We thank Sylvia Gutiérrez Erlandsson for expert support with confocal microscopy, Gloria Calderita and Juan Fontana for their contribution at the very initial stages of this work, Drs Martin Lowe and Margaret Robinson for providing antibodies and Dr Richard M. Elliott for providing reagents, reading the manuscript and helpful discussions. This research was supported by grant BFU2006-04584/BMC and BIO2009-07255 from the Ministry of Science and Innovation of Spain (C.R.). Noelia López-Montero is recipient of a contract from the Comunidad de Madrid.

References

- Attarzadeh-Yazdi, G., Fragkoudis, R., Chi, Y., Siu, R.W.C., Ülper, L., Barry, G., *et al.* (2009) Cell-to-cell spread of the RNA interference response suppresses Semliki Forest Virus (SFV) infection in mosquito cell cultures and cannot be antagonized by SFV. *J Virol* **83**: 5735–5748.
- Benedict, M.Q., Levine, R.S., Hawley, W.A., and Lounibos, L.P. (2007) Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector Borne Zoonotic Dis* **7**: 76–85.
- Bridgen, A., Weber, F., Fazakerley, J.K., and Elliott, R.M. (2001) Bunyamwera bunyavirus non-structural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 664–669.
- Brown, D.T. (1984) Alphavirus growth in cultured vertebrate and invertebrate cells. In *Vectors in Virus Biology*. Mayo, M.A., and Herrop, K.A. (eds). New York: Academic Press, pp. 113–133.
- Chandler, L.J., Wasieloski, L.P., Balir, C.D., and Beaty, B.J. (1996) Analysis of La Crosse virus S-segment RNA and its positive-sense transcripts in persistently infected mosquito tissues. *J Virol* **70**: 8972–8976.
- Chen, M.S., Obar, R.A., Schroeder, C.C., Austin, T.W., Poodry, C.A., Wadsworth, S.C., and Vallee, R.B. (1991) Multiple forms of dynamin encoded by shibire, a *Drosophila* gene involved in endocytosis. *Nature* **351**: 583–586.
- Deyde, V.M., Khristova, M.L., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., and Nichol, S.T. (2006) Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. *J Virol* **80**: 8834–8842.
- Elliott, R.M. (1990) Molecular biology of the *Bunyaviridae*. *J Gen Virol* **71**: 501–522.
- Elliott, R.M. (2009) Bunyaviruses and climate change. *Clin Microbiol Infect* **15**: 510–517.
- Flick, R., and Bouloy, M. (2005) Rift Valley fever virus. *Curr Mol Med* **5**: 827–834.
- Fontana, J., Tzeng, W.-P., Claderita, G., Fraile-Ramos, A., Frey, T.K., and Risco, C. (2007) Novel replication complex architecture in Rubella replicon-transfected cells. *Cell Microbiol* **9**: 875–890.
- Fontana, J., López-Montero, N., Elliott, R.M., Fernández, J.J., and Risco, C. (2008) The unique architecture of Bunyamwera virus around the Golgi complex. *Cell Microbiol* **10**: 2012–2028.
- Fragkoudis, R., Attarzadeh-Yazdi, G., Nash, A.A., Fazajerley, J.K., and Kohl, A. (2009) Advances in dissecting mosquito innate immune response to arbovirus infection. *J Gen Virol* **90**: 2061–2072.
- González-Bellido, P.T., Wardill, T.J., Kostyleva, R., Meinertzhagen, I.A., and Juusola, M. (2009) Overexpressing temperature-sensitive dynamin decelerates phototransduction and bundles microtubules in *Drosophila* photoreceptors. *J Neurosci* **29**: 14199–14210.
- Haller, O., and Kochs, G. (2002) Interferon-induced Mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* **3**: 710–717.
- Hase, T., Summers, P.L., Eckels, K.H., and Baze, W.B. (1987) Maturation process of Japanese encephalitis virus in cultured mosquito cells *in vitro* and mouse brain cells *in vivo*. *Arch Virol* **96**: 135–151.
- Holzinger, D., Jorns, C., Stertz, S., Boisson-Dupuis, S., Thimme, R., Weidmann, M., *et al.* (2007) Induction of MxA gene expression by influenza A virus requires type I or type III interferon signalling. *J Virol* **81**: 7776–7785.
- Jantti, J., Hilden, P., Ronka, H., Makiranta, V., Keranen, S., and Kuismanen, E. (1997) Immunocytochemical analysis of Uukuniemi virus budding compartments: role of the intermediate compartment and the Golgi stack in virus maturation. *J Virol* **71**: 1162–1172.
- Keene, K.M., Foy, B.D., Sánchez-Vargas, I., Beaty, B.J., Blair, C.D., and Olson, K.E. (2004) RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (*Alphavirus; Togaviridae*) infection of *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 17240–17245.
- Kochs, G., Janzen, C., Hohenberg, H., and Haller, O. (2002) Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 3153–3158.
- Kohl, A., Hart, T.J., Noonan, C., Royall, E., Roberts, L.O., and Elliott, R.M. (2004) A Bunyamwera virus minireplicon system in mosquito cells. *J Virol* **78**: 5679–5685.
- Kondylis, V., Goulding, S.E., Dunne, J.C., and Rabouille, C. (2001) Biogenesis of Golgi stacks in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Cell* **12**: 2308–2327.
- Kyle, J.L., and Harris, E. (2008) Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol* **62**: 71–92.
- Lappin, D.F., Nakitare, G.W., Palfreyman, J.W., and Elliott, R.M. (1994) Localization of Bunyamwera bunyavirus G1 glycoprotein to the Golgi requires association with G2 but not with NSm. *J Gen Virol* **75**: 3441–3451.
- Lowe, M., Rabouille, C., Nakamura, N., Watson, R., Jackman, M., Jämsä, E., *et al.* (1998) Cdc2 kinase directly phosphorylates the cis-Golgi matrix protein GM130 and is required for Golgi fragmentation in mitosis. *Cell* **94**: 783–793.

- McJunkin, J.E., de los Reyes, E.C., Irazutza, J.E., Caceres, M.J., Khan, R.R., Minnich, L.L., *et al.* (2001) La Crosse encephalitis in children. *N Engl J Med* **344**: 801–807.
- Mackenzie, J.S., Gubler, D.J., and Petersen, L.R. (2004) Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med* **12**: S98–S109.
- Matsuoka, Y., Chen, S.-Y., and Compans, R.W. (1994) A signal Golgi retention in the Bunyavirus G1 glycoprotein. *J Biol Chem* **269**: 22565–22573.
- Miura, T.A., Carlson, J.O., Beaty, B.J., Bowen, R.A., and Olson, K.E. (2001) Expression of human MxA protein in mosquito cells interferes with La Crosse virus replication. *J Virol* **75**: 3001–3003.
- Nakamura, N., Rabouille, C., Watson, R., Nilsson, T., Hui, N., Slusarewicz, P., *et al.* (1995) Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J Cell Biol* **131**: 1715–1726.
- Newton, S.E., Short, N.J., and Dalgarno, L. (1981) Bunyamwera virus replication in cultured *Aedes albopictus* (mosquito) cells: establishment of a persistent infection. *J Virol* **38**: 1015–1024.
- Novoa, R.R., Calderita, G., Arranz, R., Fontana, J., Granzow, H., and Risco, C. (2005a) Virus factories. Associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol Cell* **97**: 147–172.
- Novoa, R.R., Calderita, G., Cabezas, P., Elliott, R.M., and Risco, C. (2005b) Key Golgi factors for structural and functional maturation of Bunyamwera virus. *J Virol* **79**: 10852–10863.
- Overby, A.K., Pettersson, R.F., Grünwald, K., and Huiskonen, J.T. (2008) Insights into bunyavirus architecture from electron cryotomography of Uukuniemi virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 2375–2379.
- Payne, A.F., Binduga-Gajewska, I., Kauffman, E.B., and Kramer, L.D. (2006) Quantitation of flaviviruses by fluorescent focus assay. *J Virol Methods* **134**: 183–189.
- Plassmeyer, M.L., Soldan, S.S., Stachelek, K.M., Martín-García, J., and González-Scarano, F. (2005) California serogroup Gc (G1) glycoprotein is the principal determinant of pH-dependent cell fusion and entry. *Virology* **338**: 121–132.
- Ramírez-Weber, F.-A., and Kornberg, T.B. (1999) Cytonemes: cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs. *Cell* **97**: 599–607.
- Risco, C., Rodríguez, J.R., López-Iglesias, C., Carrascosa, J.L., Esteban, M., and Rodríguez, D. (2002) Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment membranes and vimentin filaments participate in vaccinia virus assembly. *J Virol* **76**: 1839–1855.
- Salanueva, I.J., Novoa, R.R., Cabezas, P., López-Iglesias, C., Carrascosa, J.L., Elliott, R.M., and Risco, C. (2003) Polymorphism and structural maturation of Bunyamwera virus in Golgi and post-Golgi compartments. *J Virol* **77**: 1368–1381.
- Sanchez-Vargas, I., Scott, J.C., Poole-Smith, B.K., Franz, A.W.E., Barbosa-Solomieu, V., Wilusz, J., *et al.* (2009) Dengue virus type 2 infection of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. *PLoS Pathog* **5**: e1000299. doi:10.1371/journal.ppat.1000299.
- Scallan, M.F., and Elliott, R.M. (1992) Defective RNAs in mosquito cells persistently infected with Bunyamwera virus. *J Gen Virol* **73**: 53–60.
- Sherer N.M., and Mothes, W. (2008) Cytonemes and tunneling nanotubes in cell-cell communication and viral pathogenesis. *Trends Cell Biol* **18**: 414–420.
- Shi, X., and Elliott, R.M. (2009) Generation and analysis of recombinant Bunyamwera orthobunyaviruses expressing V5 epitope-tagged L proteins. *J Gen Virol* **90**: 297–306.
- Shi, X., Brauburger, K., and Elliott, R.M. (2005) Role of N-linked glycans on Bunyamwera virus glycoproteins in intracellular trafficking, protein folding, and virus infectivity. *J Virol* **79**: 13725–13734.
- Shi, X., Kohl, A., Léonard, V.H.J., Li, P., McLees, A., and Elliott, R.M. (2006) Requirement of the N-terminal region of Orthobunyavirus non-structural protein NSm for virus assembly and morphogenesis. *J Virol* **80**: 8089–8099.
- Tesh, R.B., and Gubler, D.J. (1975) Laboratory studies of transovarial transmission of La Crosse and other arboviruses by *Aedes albopictus* and *Culex fatigans*. *Am J Trop Med Hyg* **24**: 876–880.
- Vasilakis, N., Deardorff, E.R., Kenney, J.L., Rossi, S.L., Hanley, K.A., and Weaver, S.C. (2009) Mosquitoes put the brake on Arbovirus evolution: experimental evolution reveals slower mutation accumulation in mosquito than vertebrate cells. *PLoS Pathog* **5**: e1000467. doi:10.1371/journal.ppat.1000467.
- Watret, G.E., Pringle, G.R., and Elliott, R.M. (1985) Synthesis of bunyavirus-specific proteins in a continuous cell line (XTC-2) derived from *Xenopus laevis*. *J Gen Virol* **66**: 473–482.
- Weaver, S.C. (2006) Evolutionary influences in arboviral disease. *Curr Top Microbiol Immunol* **199**: 285–314.
- Weber, F., Dunn, E.F., Bridgen, A., and Elliott, R.M. (2001) The Bunyamwera virus nonstructural protein NSs inhibits viral RNA polymerase in a minireplicon system. *Virology* **281**: 67–74.
- Woolhouse, M., and Gaunt, E. (2007) Ecological origins of novel human pathogens. *Crit Rev Microbiol* **33**: 231–242.
- Wymann, M.N., Flacio, E., Radczuweit, S., Patocchi, N., and Luthy, P. (2008) Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) – a threat for Switzerland? *Euro Surveill* **13**: 1–2.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Full time-course of BUNV infection in C6/36 mosquito cells. Cells infected at 1 FFU per cell were processed for detection of Gc and NC viral proteins by immunofluorescence and confocal microscopy. (A) and (B) Compiled Z stacks of confocal images show changes in the distribution of Gc (red) and NC (green) proteins for the same cells. Nuclei are labelled in blue. Gc starts in perinuclear dots and later delineates long membrane elongations (white arrow). N protein is progressively sequestered into perinuclear structures (yellow arrow). Bar, 20 µm.

Fig. S2. Frontal and lateral merge projections of control and BUNV-infected C6/36 cells at different times post infection as visualized by confocal microscopy (A) and drawings summarizing the main changes suffered by infected cell cultures with time (B).

A. Lisotracker red was added to live cell cultures and anti-BUNV followed by a secondary antibody (green) were added to fixed and non-permeabilized cells. Under these conditions the antibodies strongly label the cell plasma membrane. Small fields are the lateral merge projections of the same cells shown in the frontal projections in the contiguous larger fields. At 15 h p.i. cells become very flat (white arrowheads mark the limits of the cell) while later cells have recovered their round shape and height (white arrows).

B. Drawings indicate that infected C6/36 mosquito cell cultures develop long membranous bridges and create new intercellular contacts (acute phase). These projections later disappear when cells get together in clusters (late phase). Bar, 15 µm.

Fig. S3. Localization of BUNV non-structural protein NSm by confocal microscopy in infected C6/36 cells at different times post infection (30, 50, 75 and 150 h p.i.). Nuclei are stained in blue. A–D. Localization of NSm (green) and NC (red). NSm exhibits a characteristic reticular pattern while NC accumulates in the cytosol. Late in infection NC concentrates in the N-body while NSm is spreading in dots all over the cell. No colocalization is observed.

E–H. NSm (green) and Gc (red) colocalize in dots (assembly compartment within the viral factory).

I–L. NSm (green) and the RER marker PDI (red) colocalize during the early and acute phases of infection since NSm is synthesized in the RER compartment and then travels with the

viral glycoproteins to the Golgi complex. Later in infection colocalization decreases due to lower protein expression levels.

M–P. NSm (green) and Lysosomes (red) do not colocalize at any time confirming that patterns observed for NSm are not related to protein aggregation and degradation pathways. Bar, 15 µm.

Movie S1. C6/36 live cells infected with the fluorescent rBUNM-NSm-EGFP virus. Images were recorded every 5 min (from 20 to 35 h p.i.) and the movie shows the first 8 h (from 20 to 28 h p.i.). Non-fluorescent cells (down-left) being contacted by infected, fluorescent cells. There is little transfer of NSm-EGFP to contacted cells that remain non-fluorescent 15 h later. Images from this movie have been selected for Fig. 4B.

Movie S2. C6/36 live cells infected with the fluorescent rBUNM-NSm-EGFP virus. Images were recorded every 5 min (from 20 to 35 h p.i.). The movie shows a total of 8 h (from 20 to 28 h p.i.). Two groups of fluorescent cells on the right are connected by a bridge and later move to get together. Meanwhile, the non-fluorescent or slightly fluorescent cells (centre-left) get also interconnected with fluorescent cells and remain in their initial state.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex

Juan Fontana,¹ Noelia López-Montero,¹
Richard M. Elliott,² José Jesús Fernández³ and
Cristina Risco^{1*}

¹Cell Structure Laboratory, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Campus Universidad Autónoma, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain.

²Centre for Biomolecular Sciences, School of Biology, University of St Andrews, UK.

³Departamento de Arquitectura de Computadores, Universidad de Almería, Spain.

Summary

Viral factories are novel structures built by viruses in infected cells. During their construction organelles are recruited and build a large scaffold for viral replication and morphogenesis. We have studied how a bunyavirus uses the Golgi to build the factory. With the help of confocal and 3D ultrastructural imaging together with molecular mapping *in situ* and *in vitro* we have characterized a tubular structure that harbours the viral replication complexes in a globular domain. Numerous ribonucleoproteins were released from purified tubes disrupted *in vitro*. Actin and myosin I were identified by peptide mass fingerprinting in isolated tubes while actin and the viral NSm non-structural protein were detected in the tubes' internal proteinaceous scaffold by immunogold labelling. Studies with NSm deletion mutants and drugs affecting actin showed that both NSm and actin are key factors for tube and virus assembly in Golgi. Three-dimensional reconstructions based on oriented serial sections of infected cells showed that tubes anchor cell organelles to Golgi stacks and make contacts with intracellular viruses. We propose that this new structure, unique among enveloped viruses, assembles in association with the most stable component of Golgi stacks, the actin-containing matrix scaffold, connecting viral replication and morphogenesis inside viral factories.

Introduction

RNA viruses replicate their genome in intracellular membranes of infected cells (Mackenzie, 2005; Salonen *et al.*, 2005). Modified membranes harbouring viral replication complexes (RCs) frequently integrate into a complex structure known as the 'viral factory' where the cytoskeleton participates, cell organelles are recruited and the different steps of the virus life cycle are sequentially connected. Characterizing how this happens would help to understand how viral factors take control of cells and modify their architecture. There is no description of the mechanisms involved in the formation of most viral factories, although there is evidence that some viruses induce aggresomes and autophagosomes to generate sites of replication (Novoa *et al.*, 2005a; Wileman, 2006). Expression of early proteins such as viral polymerases is probably sufficient to program the cell for organelle recruitment and factory formation, as recently observed in cells transfected with rubella virus replicons (Fontana *et al.*, 2007).

The viral replication machinery is usually inserted in single- or double-membrane vesicles that can be associated with a variety of organelles, such as the rough endoplasmic reticulum (RER), mitochondria, the endolysosomal system and chloroplasts or vacuolar membranes in plants (Hagiwara *et al.*, 2003; Novoa *et al.*, 2005a; Salonen *et al.*, 2005; Kopeck *et al.*, 2007). Some viruses, e.g. polioviruses, induce proliferation of specific membranes creating a 'novel compartment' (Cherry *et al.*, 2006) where the viral RNA polymerase molecules can assemble bidimensional arrays (Hobson *et al.*, 2001; Lyle *et al.*, 2002). Although the purpose of this targeted localization has not been elucidated, one possibility is that association of RCs with membranes provides a structural framework for efficient replication and transfer of replicated RNA to assembly sites in contiguous membranes.

Bunyaviruses comprise a large family of RNA enveloped viruses that includes serious emergent pathogens for humans, animals and plants, and are responsible for severe episodes of encephalitis and haemorrhagic fevers in humans (Elliott, 1997). They assemble a large factory involving the Golgi complex where virus particles bud and mature (Salanueva *et al.*, 2003; Novoa *et al.*, 2005b). Bunyamwera virus (BUNV) serves as a model for the many pathogens within this family. It contains three RNA segments of negative-sense polarity. The large segment

Received 12 May, 2008; accepted 29 May, 2008. *For correspondence. E-mail crisco@cnb.csic.es; Tel. (+34) 915 854 507. Fax (+34) 915 854 506.

(L) codes for an RNA-dependent RNA polymerase (L protein), the medium segment (M) codes for a precursor polyprotein (NH₂-Gn-NSm-Gc-COOH), which is cotranslationally cleaved to yield the two virion glycoproteins (Gn and Gc) and a non-structural protein called NSm, and the smallest segment (S) codes for the nucleoprotein N and a second non-structural protein NSs in overlapping reading frames (Elliott, 1990). The NH₂-terminal domain of NSm is essential for BUNV morphogenesis (Shi *et al.*, 2006) while NSs is a non-essential protein that contributes to viral pathogenesis (Bridgen *et al.*, 2001). There is no ultra-structural description of the bunyavirus replication site that has been defined as 'cytoplasmic' (Nichol *et al.*, 2005).

Morphogenesis of coronaviruses, arteriviruses, rubiviruses and bunyaviruses is associated to the Golgi complex. The choice of the Golgi for viral replication or assembly is somehow surprising. The Golgi is a highly dynamic organelle whose function requires continual membrane and protein flow (James Morre and Mollenhauer, 2007). On the other hand, the Golgi may be an autonomous organelle with a stable framework (Seemann *et al.*, 2000). Its unique architecture is thought to depend on cytoplasmic matrix proteins and the cytoskeleton. Actin seems to participate in the preservation of the flattened shape of Golgi cisternae (Lazaro-Diequez *et al.*, 2006) and several actin-binding proteins are known to play some role in Golgi function. These include myosins and spectrins (Beck, 2005).

We have studied how a bunyavirus modifies cell structure and builds factories around the Golgi complex from early to late steps of its life cycle. In a previous study we observed that Golgi stacks contain peculiar virus-induced tubular structures in BUNV-infected cells (Salanueva *et al.*, 2003). With the help of three-dimensional reconstructions and molecular mapping *in situ* and *in vitro* we have characterized these tubular elements and discovered that they represent a new structure of viral and cellular origin. Tubes assemble in Golgi stacks where they seem to be involved in multiple functions including viral genome replication, transfer of viral ribonucleoprotein complexes to assembly sites and viral morphogenesis. We propose that this new multifunctional structure associates with the actin-containing matrix of the Golgi stacks providing a stable scaffold for viral replication and early morphogenesis.

Results

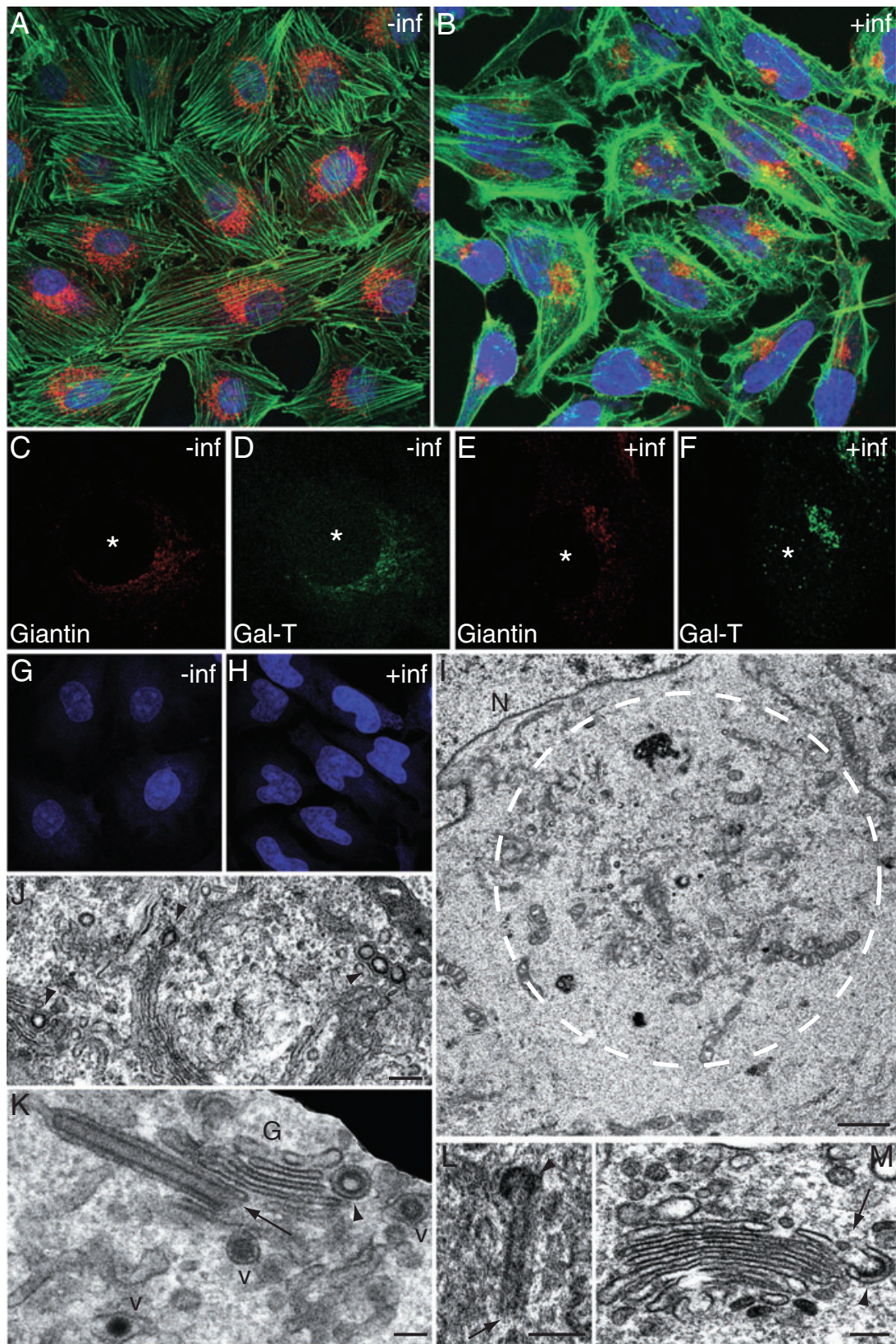
Cell architecture is deeply modified early in infection

Changes in cell organization during assembly of the viral factory were studied by confocal microscopy (Fig. 1). Control monolayers (Fig. 1A) showed round-shaped

nuclei (blue), perinuclear Golgi elements (red) and well-defined straight actin stress fibres (green). Infected cells (Fig. 1B) have a completely different aspect: nuclei are elongated, the Golgi is rounded and concentrates on one side of the nucleus, and stress fibres have moved to the cell periphery. No changes in microtubules or vimentin filaments were observed (not shown). In addition to the WGA *trans*-Golgi marker shown in Fig. 1A and B, two additional Golgi markers (giantin and galactosyl-transferase or Gal-T) exhibited a similar transition from a perinuclear distribution in non-infected cells (Fig. 1C and D) to a more compact pattern on one side of the nucleus in infected cells (Fig. 1E and F). When observing just nuclei-associated staining a depression was frequently detected, corresponding to the location of the viral factory (Fig. 1G and H). Electron microscopy (EM) showed factories as groups of organelles near the nucleus (Fig. 1I). Higher magnifications showed round-shaped and tubular structures in Golgi stacks (Fig. 1J and K). We have detected these structures in several mammalian cultured cell types that support bunyavirus replication such as BHK-21 (this study), Vero (Salanueva *et al.*, 2003) and CHO cells (not shown). Their number was higher early in infection and their viral origin was demonstrated in previous studies (Salanueva *et al.*, 2003). In the present work we have studied a large number of serial sections and discovered that viral tubes actually contain a tubular domain and a bigger globular domain on one of the extremities (Fig. 1L). The tubes are open to the cytoplasm (arrows in Fig. 1K–M).

Golgi tubular structures contain the replication complexes of the virus and interact with mitochondria

BUNV generates round-shaped and tubular structures in infected cells whose representative views in thin sections of epoxy resin are summarized in Fig. 2A–H. The Golgi-associated morphogenetic pathway of BUNV and the structural and biochemical characterization of the three viral forms have been previously described in detail (Salanueva *et al.*, 2003; Novoa *et al.*, 2005a,b). Global understanding of all these structures has been possible through a careful analysis of consecutive serial sections (see below). Condensation of material in individual Golgi sacculi originates arcs opened to the cytosol (Fig. 2A), elongated globular structures of low internal electron-density (Fig. 2B) and complete viral tubes with both globular and cylindrical domains (Fig. 2C). The two types of cross-sections originated by a viral tube are shown in Fig. 2D and E. Cross-sectioned globular heads are always > 100 nm in diameter and most of these structures have a diameter of 120–150 nm. The cylindrical domain of viral tubes has a cross-section of 80–100 nm in diameter. Virus particles have smaller diameters (Fig. 2F–H).



Budding profiles in Golgi membranes generate immature viruses or VI that are released into the lumen of a Golgi sacculus (Fig. 2F). Intermediate intracellular virus or VII exits the Golgi in secretory vesicles (Fig. 2G) and mature extracellular virions or VE are seen in the extracellular environment (Fig. 2H). All three viral forms have a diameter of around 70 nm in thin sections of epoxy resin for ultrastructural studies. In cryosections for immunogold detection of specific components structural details of viral tubes and viruses change (Fig. 2I–L). Diameter of sectioned viruses is around 65 nm while the globular domain of the viral tube is around 100–130 nm. Unequivocal views of the cylindrical domain of viral tubes are not easily obtained in cryosections. Specific labelling with the Golgi marker giantin confirmed that the viral tubes are associated to Golgi stacks (Fig. 2I). Viral polymerase L (Pol) and nucleocapsid N (Nuc) proteins are present in these globular domains as detected by immunogold labelling and EM (Fig. 2J–L). N also accumulates around Golgi membranes (Fig. 2L) while L concentrates in an internal layer of the tube globular domain (Fig. 2K). Double-stranded RNA (dsRNA), an intermediate of RNA replication (Fig. 2M and N) as well as incorporated BrUTP (Fig. 2O and P) locate in the globular domain of viral tubes according to immunogold labelling. These data strongly suggest that the globular domain of viral tubes harbours the BUNV RCs. Confocal microscopy showed RCs attached to recruited mitochondria (Fig. 2Q) and EM shows that tubes contact and sometimes fuse with the external mitochondrial membrane (Fig. 2R–T).

Isolated tubes contain RC components and RNPs

Cell fractionation and centrifugation in Optiprep gradients allowed isolation of viral tubular structures (Fig. 3A). Negative staining confirmed their general morphology: they contain a cylindrical and a globular domain (Fig. 3B and C) similar to tubes *in situ* (Fig. 1L) and a filamentous internal texture (Fig. 3D). dsRNA was detected in isolated tubes by dot-blot (Fig. 3E). Viral proteins involved in genome replication such as the RNA Pol and the Nuc protein were detected by Western blot and Coomassie blue staining, respectively (Fig. 3F). Controlled disruption of isolated tubes by saponin treatment showed a proteina-

ceous internal scaffold (Fig. 3G) that was labelled with anti-Pol and anti-Nuc antibodies (Fig. 3H and I). Complete disruption of tubes provoked the release of viral ribonucleoprotein complexes or RNPs (Fig. 3J). Similar release of RNPs was observed when disrupting isolated viruses *in vitro* (Novoa *et al.*, 2005b).

The viral non-structural NSm protein in tubular structures

NSm is a transmembrane non-structural protein involved in BUNV morphogenesis (Shi *et al.*, 2006) that accumulates in the Golgi region of infected cells (Lappin *et al.*, 1994; Shi *et al.*, 2006). Immunogold and EM showed that NSm localizes both in the cylindrical (Fig. 4A and B) and globular (Fig. 4C) domains of Golgi-associated viral tubes. NSm was detected in Golgi membranes where new virus particles are assembling (Fig. 4D). Western blot analysis confirmed the presence of NSm in isolated viral tubes and intracellular viral intermediates I and II while extracellular mature virions lacked the protein (Fig. 4E). The same result was obtained by immunogold detection of NSm and EM of isolated viruses disrupted *in vitro* (not shown). This distribution is typical for the behaviour of scaffolding proteins that assist in the assembly of immature viral precursors and are later degraded by proteolysis during maturation (Steven *et al.*, 2005). To obtain functional information about the role of NSm in viral tubes and viral particles three NSm mutants were characterized at the ultrastructural level (Fig. 4F–H). These viruses obtained by a reverse genetics approach have deletions in NSm domains III and IV (Shi *et al.*, 2006). They grow slowly generating maximum virus yields 10- to 100-fold lower than wild-type BUNV. When studying ultrathin sections of cells infected with NSm Δ 4 mutant virus, viral tubes were rarely seen. More than 200 cells infected with wild-type BUNV and an equivalent amount of cells infected with NSm Δ 4 mutant virus at 6, 10 and 24 h post infection (p.i.) were studied by oriented serial sectioning. While more than 50 viral tubes per cell were detected when infecting with the wild-type virus, a total of 12 complete tubes (longitudinal sections of the cylindrical domain) were seen in ~200 cells infected with the mutant virus. Tubes assembled by the NSm mutant were appar-

Fig. 1. Visualization of viral factories by confocal and electron microscopy.

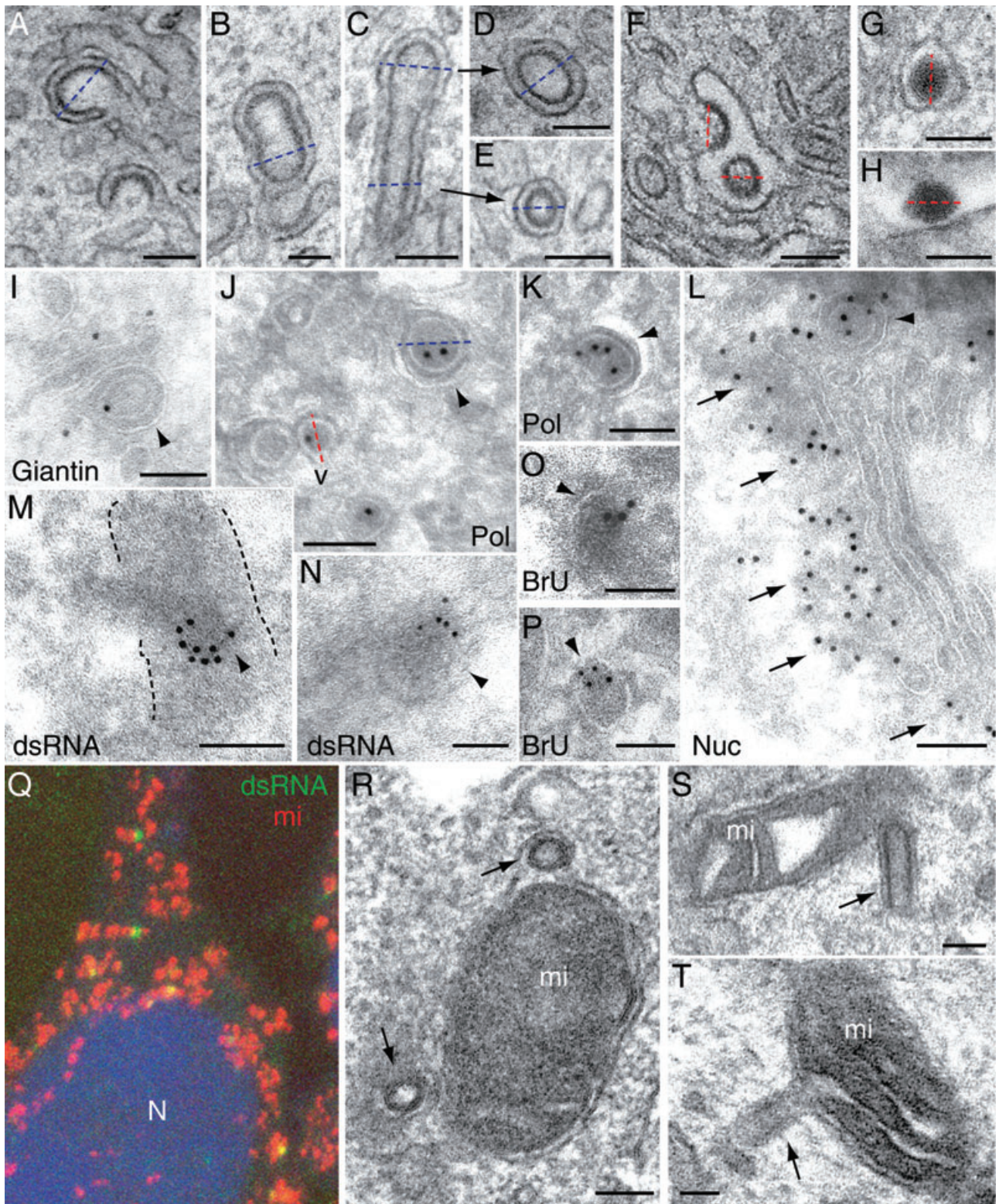
A–H. Control (A) and bunyavirus-infected (B) BHK-21 cells were labelled for *trans*-Golgi detection (WGA, red), actin (Phalloidin, green) and nuclei (To-Pro, blue) at 8 h p.i. Localization of giantin and Gal-T Golgi markers in control (C and D) and infected cells (E and F). (G) and (H) show nuclear shape in control and infected cells. Z-series projections of single optical sections are shown in (A–H).

I. Electron microscopy of viral factories shows groups of organelles near the nucleus (dashed white circle).

J. Higher magnifications of Golgi stacks in factories show globular structures of low internal electron-density (arrowheads) as well as longitudinal (arrow) and transversal (arrowhead) sections of tubular structures (K). Viral particles (V) are also seen.

L. Tubular element with elongated (arrow) and globular (arrowhead) domains.

M. Tube in a Golgi stack with an opening (arrow) near the globular domain (arrowhead). N, nucleus. Bars: 1 μ m in I; 200 nm in J; 100 nm in K–M.



ently less rigid than normal, had small heads and exhibited a diameter of 60–100 nm (Fig. 4F). Intracellular immature viral intermediates (type I viruses) accumulated in Golgi membranes which suggests a blockade in viral

particle maturation (Fig. 4G). A significant amount of viral glycoproteins was visualized at the plasma membrane by confocal microscopy (not shown) and budding profiles were also frequently seen at the cell surface (Fig. 4H).

Fig. 2. Structural characterization of the globular domain of viral tubes. (A–H) Views generated by Bunyamwera virus structures in infected cells as studied in ultrathin sections of epoxy resin. For direct size comparison the diameter of each structure is marked with blue dashed lines on tubes and red dashed lines on viruses.

A. Arcs that originate the globular domain of viral tubes.

B. Elongated globular domain.

C. Complete tube with globular head and cylindrical domain.

D and E. Cross sections of a globular and a cylindrical domain respectively.

F. Virus budding profile and immature virus (VI) in the lumen of a Golgi sacculus.

G. Intracellular transition virus (VII).

H. Extracellular mature virion (VE).

I. Immunogold detection with the Golgi marker giantin confirms that tubes are Golgi-associated (arrowhead).

J and K. Detection of BUNV viral polymerase (L or Pol) in the globular domain of tubes (arrowheads) and viral particles (v). Dashed lines are added for a direct comparison of diameters of globular heads of tubes and intracellular viruses as visualized in cryosections. Pol-associated signal in (K) aligned under the internal layer of the globular domain of the tube.

L. Viral nucleocapsid (Nuc) is also detected in the globular domain of tubes (arrowhead) and around Golgi membranes (arrows).

M and N. Immunogold detection of dsRNA in the globular domain of tubes as visualized by freeze-substitution (arrowheads). Black dashed lines in (M) indicate the external limits of the Golgi stack where the tube is inserted.

O and P. BrU detection in globular heads of tubes (arrowheads).

Q. Confocal microscopy (Z-series projection of single optical sections) shows association of viral tubes (green) with mitochondria (red) also observed by EM (arrows in R to T). (I–L), (O) and (P) show labelling on cryosections while (M) and (N) correspond to labelling on Lowicryl sections after freeze-substitution. N, nucleus; mi: mitochondria. Bars: 100 nm in A–M, O, P, R–T; 50 nm in N.

Similar results were obtained with NSmΔ3 and NSmΔ5 deletion mutants, with small differences in the amount of intracellular virus particles and budding profiles in plasma membrane compared with NSmΔ4 virus (not shown). These data confirmed an active participation of NSm protein in tube structure and virus assembly in Golgi, and pointed to viral tubes as elements involved in viral morphogenesis.

Cellular proteins in viral tubes

Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) peptide mass fingerprinting and database searching (Navarro-Lerida *et al.*, 2004) was performed to detect cellular proteins in purified tubes. The highest scores obtained from this study corresponded to cytoskeleton-associated proteins (actin, myosin I and tubulin), several ribosomal proteins, the eukaryotic translation elongation factor 2 and a retinoblastoma-like protein (Table 1). Considering the filamentous internal structure of the tubes (Fig. 3D), we focused our attention on the cytoskeletal proteins. Confocal microscopy showed that although actin

is mostly removed from the viral factory some spots of actin remained in the modified Golgi region (Fig. 5A). Omitting the actin and Golgi-associated signals showed a weak To-Pro blue staining that most probably corresponds to RNA accumulation in the factory (Fig. 5B). When the Golgi signal is omitted, thin filamentous elements of actin are distinguished (Fig. 5C). The dimensions of these filamentous structures are compatible with those of viral tubes as seen by EM. Actin was detected by Western blot in isolated tubes and intracellular viruses while it was absent in extracellular mature virions (Fig. 5D). Actin was also detected by immunogold labelling in tubes and viruses as shown in cryosections of infected cells (Fig. 5E and F) and on isolated tubes (Fig. 5G–I). Intact tubes exhibited a very weak or no immunogold signal (Fig. 5G), while tubes opened with saponin 'on grid' showed an enhanced signal on the released protein aggregates (Fig. 5H and I). An actin-associated signal was also detected on protein aggregates released from intracellular immature viruses disrupted *in vitro* (not shown). These results confirmed the presence of actin as a component of the internal fibres of viral tubes and its incorporation into immature viruses.

Table 1. Cell proteins identified in isolated viral tubes by MALDI peptide mass fingerprint.

Band No.	Accession No. (gi)	Protein name	Score ^a	Mr	Peptide matches	Sequence coverage
1	73969194	Myosin I	89	227 600	19	8%
2	6686330	Retinoblastoma-like protein 2	96	129 701	12	11%
3	26324898	Eukaryotic translation elongation factor 2	99	96 222	9	10%
4	6678469	Tubulin	77	50 562	8	23%
5	809561	Gamma-actin	94	41 335	7	21%
6	950115	Ribosomal protein S4	76	29 676	8	29%
7	58037465	Ribosomal protein L18A	74	21 004	7	39%
8	7305445	Ribosomal protein S16	66	16 460	7	37%

a. MOWSE score calculated using MASCOT search engine. Scores are significant with a *P*-value smaller than 0.05 (*P* < 0.05).

For protein identification, the non-redundant NCBI database was searched using MASCOT 2.1 (<http://www.matrixscience.com>). The following NrNCBI database versions were used: 20050928, 20051014, 20050429 and 20050611.

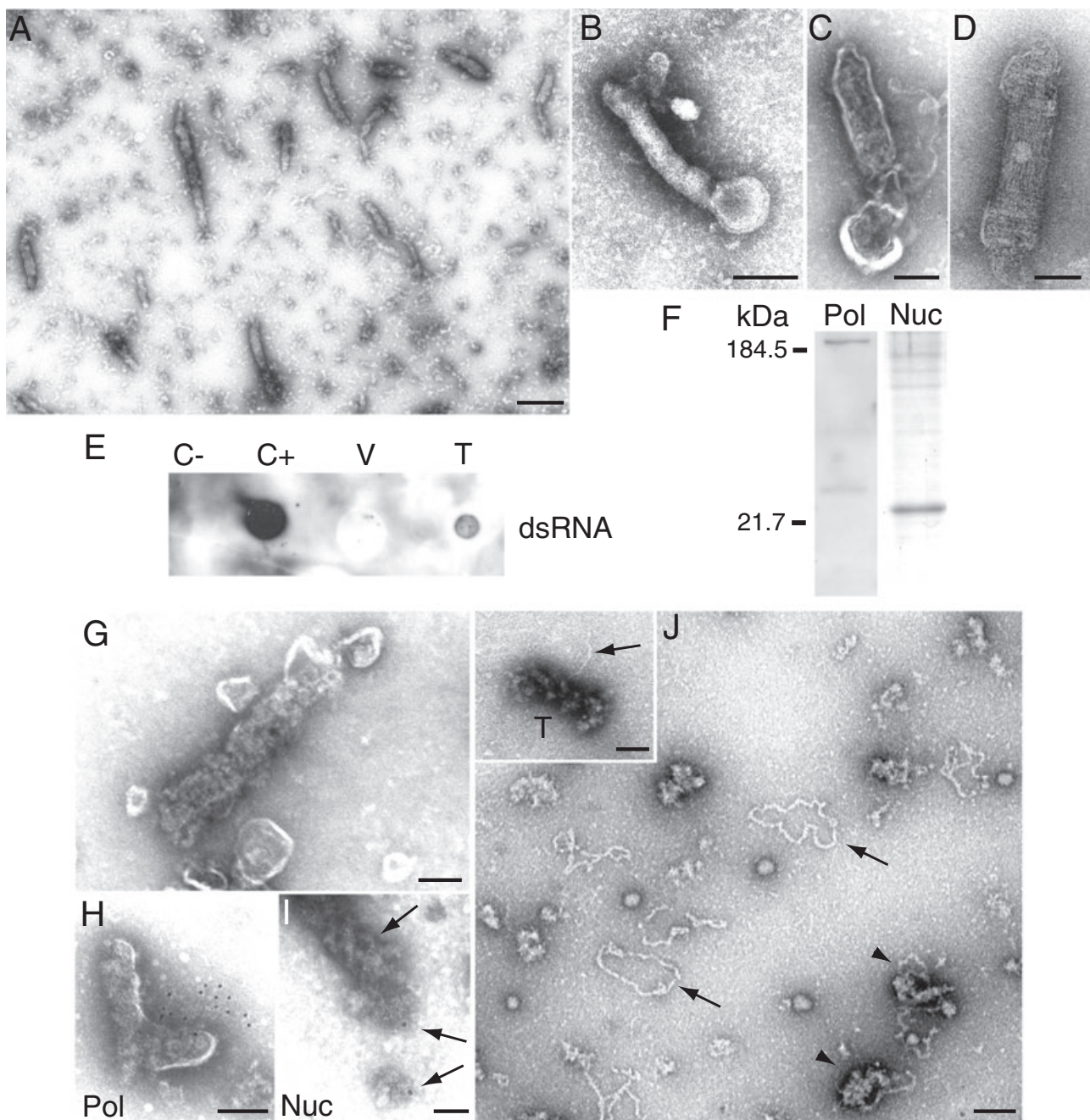


Fig. 3. Characterization of isolated tubes.

A. Negative staining of fractions enriched in viral tubes.

B. Globular and cylindrical domains are distinguished in intact tubes and in tubes submitted to a short treatment with saponin (C).

D. An internal fibrous texture is distinguished when the staining agent penetrates in the tubes.

E. Dot-blot assay shows reactivity on isolated tubes (T) with anti-dsRNA antibodies. Viral particles (V) are negative as well as a control ssRNA (C-, yeast RNA). A dsRNA virus was used as a positive control (C+).

F. Western blot detection of viral polymerase (Pol) and Coomassie blue staining corresponding to nucleocapsid (Nuc) in isolated tubes.

G. Disruption of isolated tubes with saponin shows an internal proteinaceous scaffold.

H and I. Disrupted tubes labelled with anti-Pol and anti-Nuc antibodies respectively.

J. Prolongued saponin treatment causes the complete disruption of the integrity of tubes (T) and the release of numerous RNPs (arrows in main field and inset). Arrowheads point to protein aggregates with RNPs. Bars: 300 nm in A; 100 nm in B–D, G, H and J; 50 nm in I.

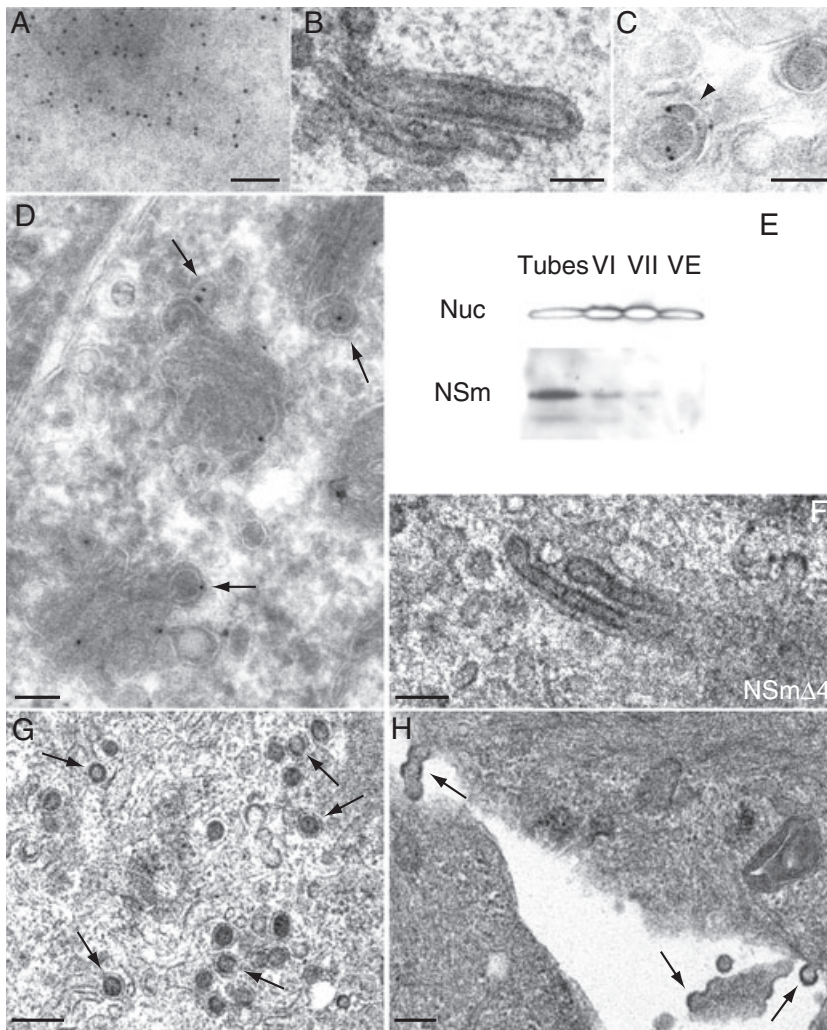


Fig. 4. Viral non-structural NSm protein and viral tubes.

A. Immunogold labelling on Lowicryl sections after freeze-substitution showing NSm in the tubular domain of a viral tube.

B. A similar tube in an epoxy-resin section is shown for comparison.

C. Labelling on cryosections also detects NSm in the globular domain of tubes and in assembling viruses in Golgi (D).

E. Western blot detection of NSm in isolated viral tubes and viral forms. Positive reaction is detected in tubes and the two intracellular viral forms (VI and VII) while no NSm is detected in extracellular virions (VE). Detection of viral nucleocapsid (Nuc) was done in the same membrane.

F. Electron microscopy shows thin tubes with small heads in BHK-21 cells infected 10 h (1 PFU/cell) with the NSm Δ 4 deletion mutant that also accumulates intracellular immature VI viral particles (arrows in G).

H. Budding profiles in plasma membrane (arrows) are also abundant in these cells.

Bars: 100 nm in A–D, F; 200 nm in G and H.

Effects of brefeldin A and drugs for actin in tube integrity and virus assembly

Assembly of viral tubes in Golgi stacks could involve Golgi membrane components or more stable Golgi matrix proteins. To test these possibilities we used brefeldin A (BFA), a drug that induces the rapid fusion of Golgi membrane with pre-Golgi membranes and RER leaving a separated scaffold of matrix components (Seemann *et al.*, 2000). From previous studies we knew that drugs disrupting *cis*- and *medial*-Golgi subcompartments block BUNV replication when added at 0–1 h p.i. (Salanueva *et al.*, 2003; Novoa *et al.*, 2005a). Thus, short BFA treatments were applied to already infected BHK-21 cells. Drug was added to the cultures at 10 h p.i., followed by immunofluorescence staining for GalT or giantin (Fig. 6A–F). At 15 or 30 min after adding BFA the immunofluorescence signal for GalT, a Golgi membrane enzyme, was rapidly fragmented and dispersed while giantin, a Golgi matrix protein, stayed in the perinuclear location for longer times.

Similar effects were seen after just 5 min of treatment (data not shown). Viral tubes deprived of surrounding Golgi membranes had normal globular and cylindrical domains (Fig. 6G–I) and maintained their internal proteinaceous scaffolds and contacts with mitochondria (Fig. 6G). Tubes with apparent connections with cytoplasmic fibres that remind cytoskeletal intermediate filaments were observed (Fig. 6H). Viral tubes with short BFA treatments then exhibited the same behaviour than giantin and remained as distinguishable structures when Golgi stacks have already disappeared.

Several drugs that affect actin such as latrunculin A (LtA), cytochalasin D (CyD) and jasplakinolide (Jpk) were also used to target actin associated to Golgi membranes. Among them, the actin-stabilizing drug Jpk provided the clearest results. LtA and CyD had very little or no effect, respectively, on viral replication and assembly as determined by measurement of infectious viral particles released to the culture supernatants at 6 and 10 h p.i. Complete tubes, virus budding profiles and viral particles

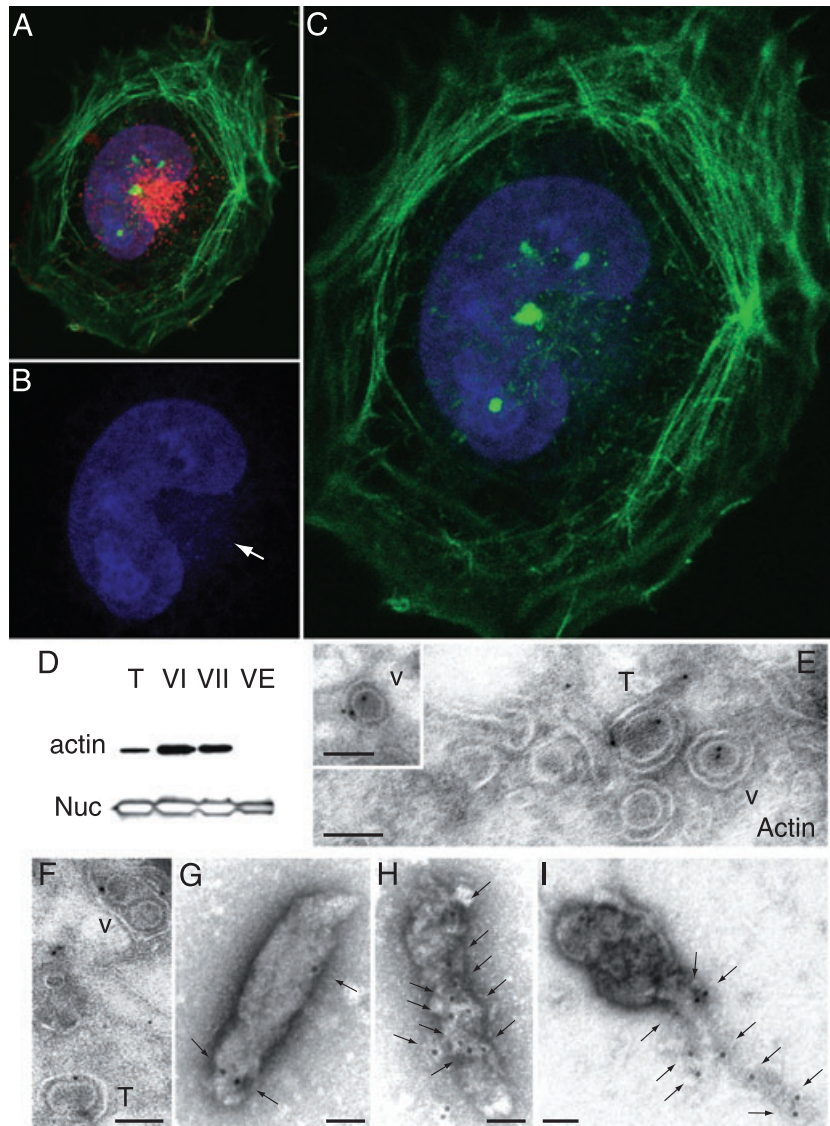


Fig. 5. Actin and viral tubes.

A. Confocal microscopy of viral factories shows a massive removal of stress fibres (Phalloidin, green) from the central areas of the cell and small spots of actin in the factory area coincident with Golgi staining (WGA, red).

B. Removal of red and green signals shows blue To-pro staining in nucleus and in the cytoplasmic factory area (white arrow).

C. Higher magnification and removal of red Golgi staining shows small, filamentous actin-containing elements in the factory. Z-series projections of single optical sections are shown in (A–C).

D. Western blot detection of actin in isolated tubes (T) and intracellular VI and VII viral forms, while no signal is detected in extracellular virions (VE). Detection of viral nucleocapsid (Nuc) was done in the same membrane.

E and F. Immunogold labelling on cryosections of infected cells showing actin-associated signal in viral particles (V) and the globular domain of viral tubes (T).

G–I. Immunogold detection of actin in isolated tubes treated with saponin. (G) Weak signal in intact tubes (arrows). (H) More intense signal in disrupted tubes (arrows). (I) Collapsed tubes with intense signals in released fibrous material (arrows). Bars: 100 nm in E and F; 50 nm in G–I.

assembled in Golgi stacks of cells treated with LtA, as observed in thin sections of treated cells studied by EM (not shown). However, treatment with Jpk led to a decrease in infectious virus release by 60–70% in cell cultures that simultaneously lose the actin stress fibres as observed by fluorescence microscopy (Fig. 6J and K). EM showed that in cells treated with Jpk cell organelles were displaced to the cell periphery against the plasma membrane (not shown) and Golgi fragments were occasionally distinguished (Fig. 6L). Intact viral tubes were not detected although their globular domains were seen in Golgi remnants (Fig. 6L) and attached to mitochondria (not shown). Viral assembly was massively displaced to the plasma membrane where budding profiles were frequently seen (Fig. 6M). Intracellular budding and viral particles in Golgi remnants were very scarce and observed exclusively in cells less affected by the drug according to

characteristic Jpk effects in ultrastructure. Budding profiles were not distinguished at the plasma membrane of normally infected cells where budding events were exclusively located in Golgi stacks, as confirmed by analysis of oriented serial sections covering all planes from each infected cell. At least 200 cells per condition were studied.

Our results strongly support a functional participation of Golgi-associated actin in assembly and function of viral tubes as well as in anchoring virus assembly sites in Golgi membranes.

3D maps of early and late viral factories show viral tubes as the physical links between recruited cell organelles

As viral tubes could play multiple functions in bunyavirus

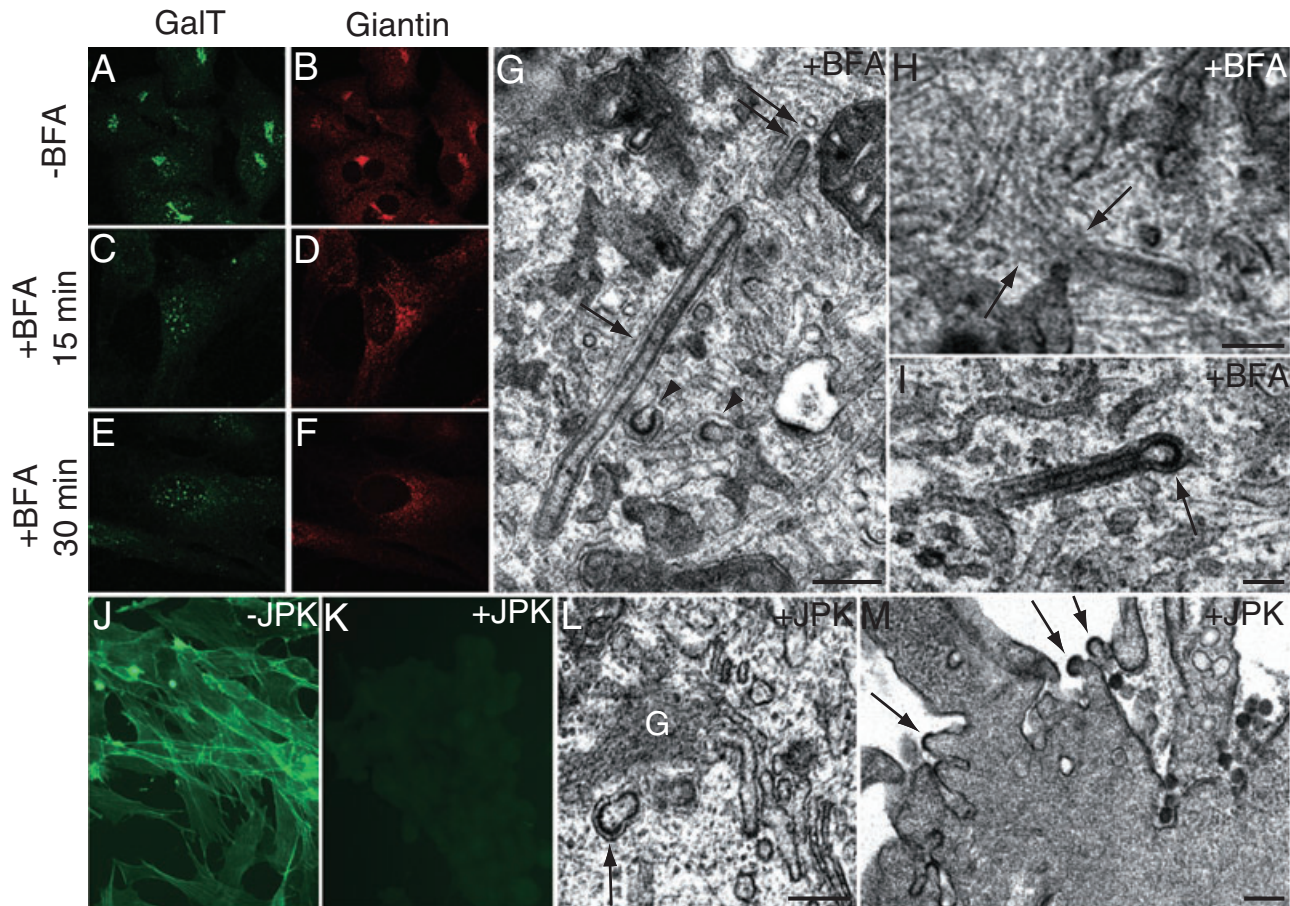


Fig. 6. Tube structure and virus assembly in the presence of drugs that affect Golgi membranes or actin integrity. Immunofluorescence microscopy of GalT and giantin in normally infected cells (5 PFU/cell) at 10 h p.i. (A and B), in infected cells treated 15 min with BFA (C and D) and in infected cells treated 30 min with BFA (E and F).

G and H. EM shows normal tubes out of Golgi stacks after 15 min with BFA.

G. Long tube (arrow) globular domains (arrowheads) and tube attached to mitochondria (double arrow).

H. Cytoplasmic filaments (arrows) apparently attached to a viral tube.

I. Normal tube with cylindrical and globular (arrow) domains after 30 min with BFA.

J and K. Fluorescence microscopy detection of actin (Phalloidin, green) in normally infected cells at 10 h p.i. (J) and in infected cells treated with JPK (drug was added at 1 h p.i.) (K).

L and M. EM of infected cells treated with JPK. Globular domain (arrow in L) in an altered Golgi stack (G) and budding profiles (arrows in M) in plasma membrane. Bars: 200 nm in G, L, M; 100 nm in H and I.

factories (replication, morphogenesis and organelle recruitment) a three-dimensional view of how they integrate in the factory and the contacts they establish with factory components can help us to understand how they work. We obtained serial sections of factories for a detailed study of the whole, complex structure. Analysis of all planes provided a much better characterization of factories compared with random planes with a more accurate quantification of numbers and dimensions of viral structures. Most tubes have a total length of 0.2–0.5 μm although tubes longer than 1 μm were occasionally seen. 3D reconstructions from serial sections were done for early (Fig. 7A–F) and late (Fig. 7G–I) factories. Early factories with few viral particles are round shaped structures near the nucleus and surrounded by mitochondria

(Fig. 7A). A close-up of the central areas of this factory showed viral tubes that connect Golgi stacks with RER cisternae (Fig. 7B). The consecutive sections corresponding to these tubes are shown in Fig. 7C. This frequent contact was never detected after random analysis of factories in 2D which points to the importance of covering all the planes of very complex structures in an oriented manner. An important contact previously detected in 2D analysis occurred between tubes and mitochondria (Fig. 7D and E). Careful study of 3D maps revealed that early factories are indeed composed of repetitive units of a basic set integrated by a Golgi stack with mitochondria, RER and one or more viral tubes (Fig. 7F). By contrast, late factories are less compact structures that have abandoned the juxtanuclear location and contain many viral

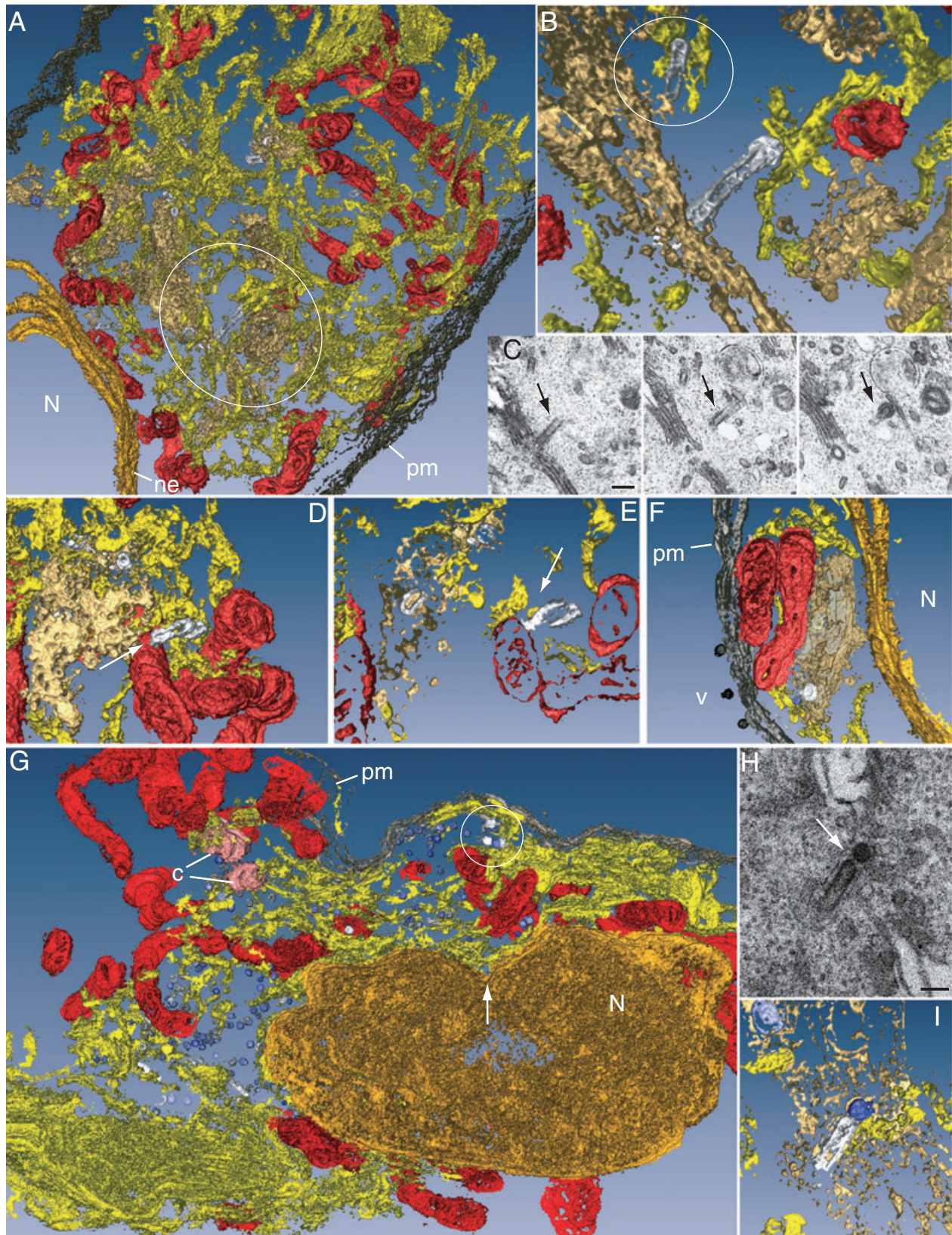


Fig. 7. 3D maps of early and late factories obtained by serial sectioning, TEM, 3D-reconstruction and image processing.

A. Large round-shaped early factory near the nucleus. Mitochondria (red) surround a network of membranes (yellow for the RER and beige for Golgi stacks) where viral tubes (grey) are embedded.
 B. 3D reconstruction of the encircled central region of the factory in (A) elaborated with the central sections of the series to show contacts between viral tubes and cell membranes in more detail. The large tube is on the centre, a smaller one is encircled.
 C. Three original serial thin sections included in the 3D map shown in (B). The central tube is marked with arrows.
 D and E. Whole volume (D) and one single plane (E) of the same area of a factory showing a clear contact between a viral tube and a mitochondrion (arrows).
 F. Basic factory unit constituted by a Golgi stack, RER elements, mitochondria and a viral tube. A viral particle is coloured in purple.
 G. 3D map of a late factory. A significant displacement of components (mitochondria in red, RER in yellow) from the nuclear cavity (arrow) to peripheral areas of the cell is observed. Golgi-associated density has been omitted in this volume for better visualization of viral particles (purple). A contact between viral tubes (grey) and viral particles (purple) is encircled.
 H and I. Original thin section and 3D reconstruction, respectively, of a viral tube touching a viral particle (arrow). N, nucleus; ne, nuclear envelope; pm, plasma membrane; v, extracellular virions; c, centrioles. Bar: 200 nm in C; 100 nm in H.

particles (Fig. 7G). Mitochondria and RER do not completely surround the factory and virus particles are moving towards the cell periphery. Physical contacts between viral tubes and new viral particles were detected as shown in the encircled area of Fig. 7G and in Fig. 7H and I. The existence of these contacts supports a role for the viral tubes as the physical connections between viral replication and morphogenesis inside the Golgi stacks of the virus factory as proposed in the model of Fig. 8.

Discussion

Viral factories are probably the most extreme examples of how viruses manipulate cell organization. It is remarkable that just a few different classes of viral macromolecular complexes can transform a whole eukaryotic cell in minutes. We are interested in understanding how this happens. At the same time, by studying viruses, we have a very valuable tool to study cell architecture.

In the present work we have characterized the bunyavirus factory built around the Golgi complex. Although the whole factory is large and complex it is in fact composed of repetitive units constituted by one or more Golgi stacks, mitochondria, RER elements and a tubular structure that acts as a link between these organelles. Further, the tubes could play multiple functions such as transfer of replicated viral genomes to assembly sites. Actin is needed both for assembly of these tubes and for virus morphogenesis in Golgi membranes. The presence of tubular structures in thin sections of mouse brain infected with BUNV was reported in old literature where they were interpreted as elongated virus particles or nucleocapsids (Murphy *et al.*, 1968). We also detected these structures in a previous study (Salanueva *et al.*, 2003) and estimated a discreet number of tubes, 2 or 3, per Golgi stack. Analysis of serial sections has provided us with a much more accurate appreciation of their real numbers, as all planes of the cell are analysed. As a consequence several new data have been obtained: tubes are in fact more abundant (more than 50 in many cells) and frequently connect with mitochondria and RER cisternae. Our structural characterization of viral

tubes in Golgi membranes was completed with a molecular mapping of the structures both *in situ* and *in vitro* after their purification from infected cells. Identification of viral factors involved in genome replication and morphogenesis as well as cell proteins such as the translation elongation factor 2 or ribosomal proteins suggested that tubes may harbour

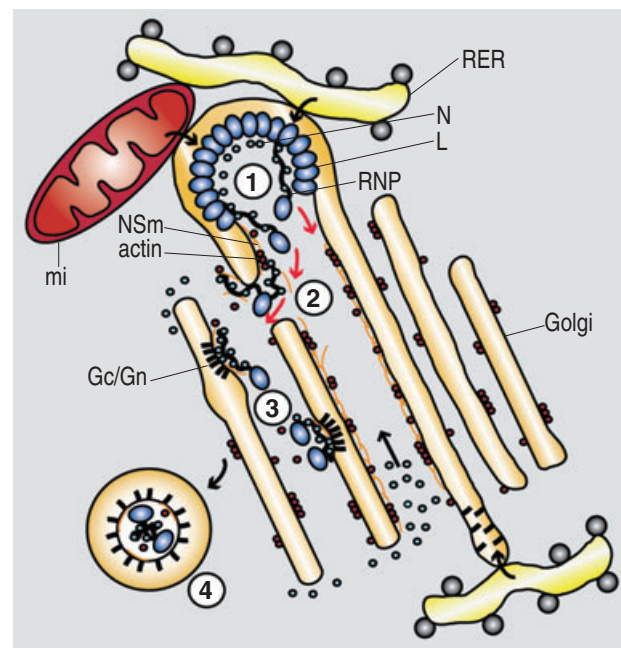


Fig. 8. Model for the functional structure of viral tubes integrated in the factory. Viral tubes assemble in association with Golgi membranes using endogenous actin and polymerized NSm as scaffold. Tubes attach to RER cisternae and mitochondria that provide cell factors needed for viral replication and assembly. Viral polymerase (L) concentrates in the globular domain. Replicated viral RNA (step 1) gets protected by interaction with N molecules, abundant around Golgi membranes and inside tubes. N molecules enter the tubes through their openings to the cytoplasm. With the help of actomyosin-based motors assembled RNPs then travel towards the cytoplasm (step 2), where they attach to the cytoplasmic domains of viral glycoproteins (Gc/Gn) concentrated in the nearby Golgi membranes. Budding events (step 3) lead to new viral particles that incorporate some amounts of the scaffold NSm protein and actin. Assembled immature viral particles are then ready for maturation and secretion (step 4).

post-replication events. A functional analysis of how altered NSm sequences or actin integrity affect factory architecture and viral assembly demonstrated that viral NSm protein and Golgi actin are essential for the structure and function of the tubes.

A sequence database comparison with BUNV NSm showed homology with NSm proteins from other bunyaviruses and a low (30%) similarity with human ATP P2X receptors. Immunoprecipitation assays showed that NSm interacts with N protein and the viral glycoproteins in infected cells (Shi *et al.*, 2006). Interestingly, NSm from tospoviruses, the plant-infecting bunyaviruses, is a movement protein associated with transport of RNPs through plasmodesmata (Storms *et al.*, 1995). In mammalian cells tube-associated NSm could facilitate the transport of RNPs from the RCs to the assembly sites. Our data suggest that NSm could act also as a 'matrix' protein, facilitating binding of RNPs to the cytosolic domains of viral glycoproteins Gc and Gn in Golgi membranes. In fact its behaviour as a scaffolding protein that assists in viral assembly is supported by its presence in immature viral intermediates and its absence in mature extracellular virions. During tube assembly NSm aggregates seem to grow from the cytosolic side towards the interior of Golgi sacculi creating a new space (Fig. 1K). As *in situ* labelling experiments showed that actin and giantin are inside viral tubes when they are normally facing the cytosolic side of Golgi membranes, interactions of viral proteins with Golgi actin and matrix proteins could be essential for tube assembly.

Despite its highly organized structure the Golgi complex is a very dynamic organelle (James Morre and Mollenhauer, 2007). Nevertheless, the Golgi manages to maintain its high degree of structural organization thanks to a large group of Golgi-resident proteins that form a matrix. Various cytoskeletal networks together with coiled-coil proteins of the golgin family, such as the *cis*-golgins p115, GM130 and giantin, are components of this Golgi matrix (Short *et al.*, 2005) that has been visualized by EM of detergent-extracted Golgi stacks (Fath and Burgess, 1993). Microtubules and associated motor proteins and the actin cytoskeleton are of particular importance in Golgi organization. Accordingly, several myosin motors localize to the organelle, where they are thought to contribute to the formation and transport of Golgi vesicles. Complex molecular machineries regulate actin dynamics involved in transport events in Golgi membranes (Fath *et al.*, 1997; Beck, 2005).

Viruses manipulate actin in many different ways. They use actin for entry, intracellular transport, or cell-to-cell transmission (Pelkmans *et al.*, 2002; Fackler and Krausslich, 2006; Radtke *et al.*, 2006). Actin is involved in replication and transcription of both nuclear and cytoplasmic viruses and the infectious particles of retroviruses, herp-

esviruses, and picornaviruses contain actin (Grunewald *et al.*, 2003; Radtke *et al.*, 2006). When the actin cytoskeleton is destroyed with specific drugs a compaction of the Golgi complex is observed (Lazaro-Diequez *et al.*, 2006). Curiously, this altered Golgi is very similar to the round-shaped organelle we observed in BUNV factory whose assembly occurs simultaneously with relocation of stress fibres to the cell periphery (Fig. 1). In an attempt to test the potential function of actin in the structure and function of viral tubes we have used three actin-disrupting drugs. Two of them depolymerize filamentous actin (CyD and LtA) while the third one stabilizes filamentous actin (Jpk). Jpk stabilizes actin filaments *in vitro*, but *in vivo* it induces polymerization of monomeric actin into amorphous masses enhancing the rate of actin filament nucleation and disordered polymeric actin (Bubb *et al.*, 2000). We used three drugs with different actin binding sites and different mechanisms of action because we wanted to target molecules associated to a very particular structure, the tubes inserted in Golgi stacks. Although we knew that viral tubes are open to the cytosol, we were not sure about efficiency and accessibility of drugs to actin molecules integrated in the tubular structure. In fact, while actin-depolymerizing drugs had little effect on viral tube structure and virus production, the F-actin-stabilizing drug Jpk altered the structure of viral tubes, the location of virus assembly sites and the release of infectious virus particles to the culture supernatants. Golgi-associated actin seems to play a structural role in maintaining the structural integrity of the viral tubes in Golgi membranes.

Brefeldin A is a drug that induces redistribution of most Golgi-localized proteins to the ER. Studies on the nature of the Golgi matrix scaffold showed that giantin, GM130, GRASP65 and GRASP55 end up in membranes called BFA remnants that are distinct from the ER (Seemann *et al.*, 2000). These results supported the idea of a pre-existing template for Golgi stacks composed by these and other proteins. By using BFA we wanted to study if viral tubes disappear immediately when Golgi membranes fuse with the ER or if they stay for longer times following a common behaviour with the Golgi matrix scaffold. Like giantin viral tubes resisted short BFA treatments, which suggests they could be bound to the stable scaffold of Golgi stacks. Interestingly, integrity of Golgi actin and viral NSm protein is also important for viral tube structure and normal production of infectious virions. Our working hypothesis is that assembly of these viruses happens in Golgi membranes because replication machinery anchors in Golgi matrix components. A detailed study with silencing experiments and transfections with mutated components will be necessary to determine if particular Golgi matrix components are specifically involved in the organization and activities of viral tubes. Also to explore if myosin I molecules detected in isolated tubes are partici-

pating in transport of RNPs from the RCs to the assembly sites in nearby Golgi membranes.

According to our data, in particular the information coming from 3D maps and molecular detection, multiple interactions and movement of molecules must take place in viral tubes, as proposed in the working model of Fig. 8. Tubes represent a new structure that, in communication with the cytosol, would host viral RNA replication and assembly of RNPs in a protective environment, facilitating the posterior transfer of RNPs to the assembly sites. The unusual cylindrical shape of this viral RC-containing structure might be related with the organization of Golgi sacculi where viral tubes are anchored. Actin and other matrix proteins can form the cellular protein scaffold for NSm interactions and tube growth while the actomyosin-based motors might mediate macromolecular movements. Contacts with RER and mitochondria most probably provide necessary factors for tube functions. Future work aims to locate viral and cellular proteins in tubes after 3D reconstruction by electron tomography (Cyrklaff *et al.*, 2005; McIntosh *et al.*, 2005). Although factories are very large and complex structures for electron tomography we plan to use 3D maps from serial section reconstructions to assist in segmentation and interpretation of tomograms. In fact, our results also demonstrate that methods of 3D reconstruction from serial sections can benefit from the same principles of segmentation and noise reduction common to electron tomography. These procedures provide three-dimensional maps with enough resolution and details to analyse contacts between small elements such as virus assemblies inside very large and complex structures such as whole eukaryotic cells. This will hopefully help us to understand how viral macromolecular complexes interact with cell components to create the unique architecture of virus factories.

Experimental procedures

Cells, viruses, antibodies

BHK-21 (C13) cells supplied by the American Type Culture Collection (ATCC) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% foetal calf serum from Reactiva S.A. (Barcelona, Spain). BUNV (ATCC VR-87) was propagated and subjected to titre determination in BHK-21 cells by a lysis-plaque-forming assay, as previously described (Salanueva *et al.*, 2003). BUNVs containing deletions in the gene for NSm protein and designated rBUNM-NSm Δ 3 (aminoacids 354–400 were deleted from the M polyprotein), rBUNM-NSm Δ 4 (deleted aminoacids, 377–426) and rBUNM-NSm Δ 5 (deleted aminoacids, 410–456) were generated by reverse genetics as described (Shi *et al.*, 2006). The MAB742 monoclonal antibody against *Bunyamwera* Gc glycoprotein, and an anti-NSm rabbit antiserum against the peptide TDQKYTLDEIADVLQA (residues 338–353 of the M segment precursor) were described previously (Watret *et al.*, 1985; Nakitare and Elliott, 1993; Lappin *et al.*, 1994).

Rabbit antisera against the amino- and the carboxyl-terminal domains of viral L protein were previously characterized (Jin and Elliott, 1992). Rabbit anti-N antiserum was obtained by immunization with a synthetic peptide corresponding to the amino-terminal peptide of the protein (MIELEFHDVAANTSST) following standard procedures. The anti-giantin rabbit antiserum was a kind gift of M. Renz (Institute of Immunology and Molecular Genetics, Karlsruhe, Germany). Anti- β actin (clone AC-15) and A2668 rabbit anti-actin antiserum were from Sigma. Anti-Gal-T and anti-dsRNA K2 MABs were kindly provided by T. Suganuma (Department Anatomy, Miyazaki Medical College, Japan) and N. Lukacs (Biological Research Center, Institute of Plant Biology, Szeged, Hungary), respectively. Anti-dsRNA J2 MAb was purchased from English and Scientific Consulting (Hungary). Anti-dsRNA antibodies have been validated as markers of viral replication for different RNA viruses (Schonborn *et al.*, 1991; Westaway *et al.*, 1999). Fluorescent secondary antibodies, Alexa 549, phalloidin (green), WGA (wheat germ agglutinin, red) and ToPro (marker for nuclei) were purchased from Molecular Probes/Invitrogen.

Infections and treatments with drugs

Monolayers of BHK-21 cells were infected with BUNV or NSm deletion mutant viruses at a multiplicity of infection (moi) of 1 or 5 plaque forming units (PFU) per cell. At 6, 8, 10 or 24 h p.i. culture supernatants were removed and cell monolayers processed for immunofluorescence or EM. Monolayers at 10 h p.i. were incubated 5, 15 or 30 min with culture medium containing 5 μ g ml⁻¹ BFA. For treatment with drugs for actin culture supernatants were removed at 1 h p.i. and substituted by medium with 2 μ M CyD, 1 μ M LtA or 0.5 μ M Jpk. At 10 h p.i. cells were fixed and processed for microscopy.

Fluorescence and confocal microscopy

Cell monolayers grown on glass coverslips were fixed 20 min at 4°C with 4% paraformaldehyde in PBS before processing for immunolabelling of viral and cellular components as previously described (Novoa *et al.*, 2005b; Fontana *et al.*, 2007). A Zeiss Axiophot fluorescence microscope equipped with a MicroMax digital camera and a Bio-Rad Radiance 2100 confocal laser microscope were used for image collection.

Transmission electron microscopy

Cell monolayers were fixed 1 h at room temperature with a mixture of 1% glutaraldehyde and 0.5% tannic acid in HEPES buffer (pH 7.4) and processed by conventional embedding in the epoxy-resin EML-812 (Taab Laboratories) or in Lowicryl K4M (Taab) after cryo-processing by freeze-substitution as described (Fontana *et al.*, 2007). Ultrathin sections (50–70 nm) were collected on copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate or processed for immunogold labelling, and studied in a JEOL 1200-EX II electron microscope operating at 80 kv. Cryo-sections were obtained in an ultracryomicrotome (Leica EM FCS) operating at –120°C by the standard Tokuyasu method as described (Salanueva *et al.*, 2003). For immunogold labelling primary antibodies were diluted in saturation buffer (PBS containing 1% BSA) as follows: 1:100 for anti-giantin, anti-L, anti-NSm

and rabbit anti-actin, 1:200 for anti-N and 1:50 for anti-dsRNA. Secondary antibodies conjugated with 10 nm colloidal gold particles from BBC were diluted 1:40 in the same buffer. Negative staining of isolated tubes and viruses was performed with uranyl acetate using standard procedures. For immunogold labelling samples adsorbed to EM grids were submitted to short incubations with primary and secondary antibodies before negative staining as described (Novoa *et al.*, 2005b).

BrUTP labelling

The newly synthesized viral RNA in BUNV-infected BHK-21 cells was labelled from 4 to 5 h p.i. with 10 mM BrUTP (Sigma). At 1 h before labelling, 10 µg of actinomycin D (Sigma) per ml was added to the medium to block cellular RNA synthesis. BrUTP was introduced into cells using DOTAP Liposomal Transfection Reagent (Roche) as described (Westaway *et al.*, 1999). Incubation with the mixture BrUTP-DOTAP-actinomycin D was maintained 1 h at 37°C. Cells were then washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde + 0.05% glutaraldehyde in PBS and processed for cryosectioning and immunogold labelling using a monoclonal anti-bromodeoxyuridine antibody (Sigma) diluted 1:5 in saturation buffer followed by a secondary antibody-colloidal gold conjugate as described above.

Isolation and structural characterization of viral tubes

The established protocol for the isolation of intracellular viruses (Novoa *et al.*, 2005b) was slightly modified for the purification of more labile structures such as the viral tubes. BHK-21 cells were infected at an moi of 3 PFU/cell and maintained 10 h at 37°C. Cells were washed and collected in TEN buffer containing protease inhibitors (Roche), and frozen at -80°C. After two consecutive cycles of freezing and thawing to release the viral tubes, cell lysate was clarified by centrifugation at 3700 g, 20 min at 4°C. Supernatant was centrifuged 2.5 h at 67 000 g through a 30% (w/v) sucrose cushion. Pellet was re-suspended in 150 µl of TEN with protease inhibitors and applied to a 15–25% (v/v) Optiprep iodixanol density gradient (Sigma). Centrifugation of samples was performed for 1.5 h at 250 000 g. Fractions of 250 µl were collected from the top of the gradient and processed for structural and biochemical characterization. Complete intact tubes localized in fractions 15–20 from the top, well separated from intracellular viral particles (fractions 27–38).

Controlled disruption of isolated tubes was done with saponin after adsorbing them on hydrophilic EM grids. Tubes were incubated with saponin (0.05% in PBS) during 15 s, 30 s or 1 min. After washing with PBS grids were processed for negative staining or immunogold labelling.

Biochemical analysis of isolated viral tubes: SDS-PAGE and Western blot

Purified viral tubes were processed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) with 8%, 11% or 14% acrylamide gels. Coomassie blue staining was used to visualize protein bands (Novoa *et al.*, 2005b). For Western blot analysis proteins were transferred from gels to nitrocellulose membranes by standard blotting

procedures. Membranes were saturated overnight at 4°C with PBS containing non-fat dry milk and 0.05% Tween 20, and incubated 1 h at room temperature with primary antibodies diluted in saturation buffer (1:200 for anti-L, 1:200 for anti-NSm and 1:200 for anti-β actin). After washing with this buffer, membranes were incubated with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody diluted 1:2000. Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence (ECL kit, Amersham).

For RNA dot-blotting samples were processed under RNase-free conditions as described (Brown *et al.*, 2004). Samples were incubated overnight at 37°C in a mixture of 1 mg ml⁻¹ proteinase K and 1% SDS in DEPC water. A positive control (dsRNA Birnavirus IBDV, E5 strain) kindly provided by Dr. D. Luque (CNB, Madrid), a negative control (yeast RNA from Sigma), purified extracellular BUNV virions and fractions enriched in intracellular viral tubes were applied to nitrocellulose membranes. Membranes were allowed to dry at room temperature during 15 min and processed for immunodetection of total RNA. After incubation with saturation buffer (5% dry milk in PBS) membranes were incubated 2 h with a mixture of J2 and K2 anti-dsRNA antibodies (diluted 1:100 each in saturation buffer), washed three times with the same buffer and incubated 1 h with a secondary antibody conjugated with horse radish peroxidase diluted 1:2000 in saturation buffer. After several washes in saturation buffer signal in membranes was visualized by chemiluminescence (ECL kit, Amersham).

Peptide mapping

Fractions containing tubes as detected by negative staining and EM and fractions without tubes were submitted to SDS-PAGE using 8% and 15% acrylamide gels to cover a wide molecular weight range. Exclusive bands in fractions containing viral tubes were processed by MALDI peptide mass fingerprinting and database searching as described (Navarro-Lerida *et al.*, 2004).

Serial section 3D reconstruction

Ultrathin consecutive sections of approximately 50 nm were collected on Formvar-coated parallel-bar copper grids and stained with uranyl acetate and lead citrate and studied by EM. After selecting an interesting region in the series, photographs were taken at 25 000× magnification. Using an EPSON perfection Photo 3170 scanner the photographs were digitized at 300 dpi as 8-bit images with a final pixel size of 3.39 nm. The images were then normalized using the Bsoft software (Heymann and Belnap, 2007; <http://lsbr.niams.nih.gov/bsoft/>). Sections were aligned by selected traces between two consecutive sections using the free editor for serial section microscopy 'Reconstruct' (Fiala 2005; <http://www.synapse-web.org/tools/index.stm/>) taking into account the 'tips for aligning sections' of the User's manual. As sections had an average thickness of 50 nm the voxel in the serial section 3D reconstruction had an anisotropic size of 3.39 nm in XY axis and 50 nm in Z axis. Segmentation and 3D visualization were done with Amira (<http://amira.zib.de>). For noise-reduction, images were subjected to three iterations of a median filter (van der Heide *et al.*, 2007). Isosurface was used for 3D visualization, and the optimal threshold for the different materials was determined using a previously implemented algorithm (Cyrklaff *et al.*, 2005). Only elements with unequivocal identity

were included in the 3D representations. A total of 23 factories were studied by 3D reconstruction of serial sections and 15–20 sections per series were included. As individual sections have a thickness of 50–70 nm, the total thickness of the 3D maps in the Z axis was around 1 µm.

Acknowledgements

This work was supported by grants BMC2003-01630 and BFU2006-04584/BMC from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (to C. Risco), JA-P06-TIC01426 and MEC-TIN2005-00447 (to J.J. Fernández) and Wellcome Trust Programme Grants 065121 and 079810 (to R.M. Elliott). Juan Fontana and Noelia López-Montero are recipients of contracts from the Comunidad de Madrid. We thank Sylvia Gutiérrez Erlandsson for expert support with confocal microscopy and Silvia Juárez for her support with peptide mass fingerprinting studies, Reyes Novoa and Gloria Calderita for technical assistance, Sonia Ruiz and Carmen López-Iglesias for support with cryosections, Xiaohong Shi for manuscript reading and Alberto Fraile-Ramos for helpful discussions and critically reading the manuscript.

References

- Beck, K.A. (2005) Spectrins and the Golgi. *Biochim Biophys Acta* **1744**: 374–382.
- Bridgen, A., Weber, F., Fazakerley, J.K., and Elliott, R.M. (2001) Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 664–669.
- Brown, T., Mackey, K., and Du, T. (2004) Analysis of RNA by Northern and slot blot hybridization. In *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (eds). New York: John Wiley & Sons, Suppl 67, 4.9.1–4.9.1
- Bubb, M.R., Spector, I., Beyer, B.B., and Fosen, K.M. (2000) Effects of Jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. *J Biol Chem* **275**: 5163–5170.
- Cherry, S., Kunte, A., Wang, H., Coyne, C., Rawson, R.B., and Perrimon, N. (2006) COPI activity coupled with fatty acid biosynthesis is required for viral replication. *PLoS Pathog* **2**: 900–912.
- Cyrklaff, M., Risco, C., Fernandez, J.J., Jimenez, M.V., Esteban, M., Baumeister, W., and Carrascosa, J.L. (2005) Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 2772–2777.
- Elliott, R.M. (1990) Molecular biology of the Bunyaviridae. *J Gen Virol* **71**: 501–522.
- Elliott, R.M. (1997) Emerging viruses: the Bunyaviridae. *Mol Med* **3**: 572–577.
- Fackler, O.T., and Krausslich, H.G. (2006) Interactions of human retroviruses with the host cell cytoskeleton. *Curr Opin Microbiol* **9**: 409–415.
- Fath, K.R., and Burgess, D.R. (1993) Golgi-derived vesicles from developing epithelial cells bind actin filaments and possess myosin-I as a cytoplasmically oriented peripheral membrane protein. *J Cell Biol* **120**: 117–127.
- Fath, K.R., Trimbura, G.M., and Burgess, D.R. (1997) Molecular motors and a spectrin matrix associate with Golgi membranes in vitro. *J Cell Biol* **139**: 1169–1181.
- Fiala, J.C. (2005) Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. *J Microsc* **218**: 52–61.
- Fontana, J., Tzeng, W.P., Calderita, G., Fraile-Ramos, A., Frey, T.K., and Risco, C. (2007) Novel replication complex architecture in rubella replicon-transfected cells. *Cell Microbiol* **9**: 875–890.
- Grunewald, K., Desai, P., Winkler, D.C., Heymann, J.B., Belnap, D.M., Baumeister, W., and Steven, A.C. (2003) Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science* **302**: 1396–1398.
- Hagiwara, Y., Komoda, K., Yamanaka, T., Tamai, A., Meshi, T., Funada, R., et al. (2003) Subcellular localization of host and viral proteins associated with tobamovirus RNA replication. *EMBO J* **22**: 344–353.
- van der Heide, P., Xu, X.P., Marsh, B.J., Hanein, D., and Volkman, N. (2007) Efficient automatic noise reduction of electron tomographic reconstructions based on iterative median filtering. *J Struct Biol* **158**: 196–204.
- Heymann, J.B., and Belnap, D.M. (2007) Bsoft: image processing and molecular modeling for electron microscopy. *J Struct Biol* **157**: 3–18.
- Hobson, S.D., Rosenblum, E.S., Richards, O.C., Richmond, K., Kirkegaard, K., and Schultz, S.C. (2001) Oligomeric structures of poliovirus polymerase are important for function. *EMBO J* **20**: 1153–1163.
- James Morre, D., and Mollenhauer, H.H. (2007) Microscopic morphology and the origins of the membrane maturation model of Golgi apparatus function. *Int Rev Cytol* **262**: 191–218.
- Jin, H., and Elliott, R.M. (1992) Mutagenesis of the L protein encoded by Bunyamwera virus and production of monospecific antibodies. *J Gen Virol* **73**: 2235–2244.
- Kopeck, B.G., Perkins, G., Miller, D.J., Ellisman, M.H., and Ahlquist, P. (2007) Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle. *PLoS Biol* **5**: 2022–2034.
- Lappin, D.F., Nakitare, G.W., Palfreyman, J.W., and Elliott, R.M. (1994) Localization of Bunyamwera bunyavirus G1 glycoprotein to the Golgi requires association with G2 but not with NSm. *J Gen Virol* **75**: 3441–3451.
- Lazaro-Diequez, F., Jimenez, N., Barth, H., Koster, A.J., Renau-Piqueras, J., Llopis, J.L., et al. (2006) Actin filaments are involved in the maintenance of Golgi cisternae morphology and intra-Golgi pH. *Cell Motil Cytoskeleton* **63**: 778–791.
- Lyle, J.M., Bullitt, E., Bienz, K., and Kirkegaard, K. (2002) Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science* **296**: 2218–2222.
- Mackenzie, J. (2005) Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic* **6**: 967–977.
- McIntosh, R., Nicastro, D., and Mastrorade, D. (2005) New views of cells in 3D: an introduction to electron tomography. *Trends Cell Biol* **15**: 43–51.
- Murphy, F.A., Harrison, A.K., and Tzianabos, T. (1968) Electron microscopic observations of mouse brain infected with Bunyamwera group arboviruses. *J Virol* **2**: 1315–1325.
- Nakitare, G.W., and Elliott, R.M. (1993) Expression of the Bunyamwera virus M genome segment and intracellular localization of NSm. *Virology* **195**: 511–520.

- Navarro-Lerida, I., Martinez Moreno, M., Roncal, F., Gavilanes, F., Albar, J.P., and Rodriguez-Crespo, I. (2004) Proteomic identification of brain proteins that interact with dynein light chain LC8. *Proteomics* **4**: 339–346.
- Nichol, S.T., Beaty, B., Elliott, R.M., Goldbach, R., Plyusnin, A., Schmaljohn, A.R., and Tesh, R.B. (2005) Bunyaviridae. In *Virus Taxonomy*. Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L.A. (eds). Amsterdam: Elsevier, pp. 695–716.
- Novoa, R.R., Calderita, G., Arranz, R., Fontana, J., Granzow, H., and Risco, C. (2005a) Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol Cell* **97**: 147–172.
- Novoa, R.R., Calderita, G., Cabezas, P., Elliott, R.M., and Risco, C. (2005b) Key Golgi factors for structural and functional maturation of bunyamwera virus. *J Virol* **79**: 10852–10863.
- Pelkmans, L., Puntener, D., and Helenius, A. (2002) Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296**: 535–539.
- Radtke, K., Dohner, K., and Sodeik, B. (2006) Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol* **8**: 387–400.
- Salanueva, I.J., Novoa, R.R., Cabezas, P., Lopez-Iglesias, C., Carrascosa, J.L., Elliott, R.M., and Risco, C. (2003) Polymorphism and structural maturation of bunyamwera virus in Golgi and post-Golgi compartments. *J Virol* **77**: 1368–1381.
- Salonen, A., Ahola, T., and Kaariainen, L. (2005) Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr Top Microbiol Immunol* **285**: 139–173.
- Schonborn, J., Oberstrass, J., Breyel, E., Tittgen, J., Schumacher, J., and Lukacs, N. (1991) Monoclonal antibodies to double-stranded RNA as probes of RNA structure in crude nucleic acid extracts. *Nucleic Acids Res* **19**: 2993–3000.
- Seemann, J., Jokitalo, E., Pypaert, M., and Warren, G. (2000) Matrix proteins can generate the higher order architecture of the Golgi apparatus. *Nature* **407**: 1022–1026.
- Shi, X., Kohl, A., Leonard, V.H., Li, P., McLees, A., and Elliott, R.M. (2006) Requirement of the N-terminal region of orthobunyavirus nonstructural protein NSm for virus assembly and morphogenesis. *J Virol* **80**: 8089–8099.
- Short, B., Haas, A., and Barr, F.A. (2005) Golgins and GTPases, giving identity and structure to the Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta* **1744**: 383–395.
- Steven, A.C., Heymann, J.B., Cheng, N., Trus, B.L., and Conway, J.F. (2005) Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. *Curr Opin Struct Biol* **15**: 227–236.
- Storms, M.M., Kormelink, R., Peters, D., Van Lent, J.W., and Goldbach, R.W. (1995) The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology* **214**: 485–493.
- Watret, G.E., Pringle, C.R., and Elliott, R.M. (1985) Synthesis of bunyavirus-specific proteins in a continuous cell line (XTC-2) derived from *Xenopus laevis*. *J Gen Virol* **66**: 473–482.
- Westaway, E.G., Khromykh, A.A., and Mackenzie, J.M. (1999) Nascent flavivirus RNA colocalized *in situ* with double-stranded RNA in stable replication complexes. *Virology* **258**: 108–117.
- Wileman, T. (2006) Aggresomes and autophagy generate sites for virus replication. *Science* **312**: 875–878.

EDUCATIONAL ARTICLE: STRUCTURAL ANALYSIS OF VIRAL FACTORIES: FROM CONVENTIONAL MICROSCOPY TO ELECTRON TOMOGRAPHY.

Juan Fontana¹, Noelia López-Montero¹ and Cristina Risco¹⁺

¹Cell Structure Laboratory, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C.S.I.C. Campus Universidad Autónoma, Cantoblanco, Madrid, Spain.
crisco@cnb.uam.es

* J.F. and N. L.-M. contributed equally to this work

Received on November 14th, 2007. Accepted on December 3rd 2007

Published on-line December 14th, 2007.

Abstract

Viral factories are large structures built by cellular and viral components where viruses insert the macromolecular complexes needed for genome replication and morphogenesis of new viral particles. We are studying how factories are built and work with the assistance of a variety of electron microscopy (EM) methods. Our goal is to obtain three-dimensional (3D) maps of these very complex structures to study how replication complexes are formed, how replicated genomes are transferred to assembly sites and how new, infectious viral particles assemble and mature inside the factories. In the present work we revise EM techniques that provide 3D information of cells to describe how we can apply them to characterize the complex organization of virus factories. Reconstructions from serial sections and metal replicas after freeze-fracture provide 3D maps of medium resolution that we plan to use as complementary tools to assist in the interpretation of the very complex maps of cells to be obtained by electron tomography (ET). Within this context viruses are providing us with models to understand cellular trafficking pathways and cell architecture.

Resumen

Las factorías virales son grandes estructuras construidas por componentes celulares y virales, donde los virus insertan los complejos macromoleculares necesarios para la replicación del genoma y la morfogénesis de nuevas partículas virales. Estamos estudiando cómo las factorías se construyen aplicando varios métodos de microscopía electrónica (ME). Nuestro objetivo es obtener mapas tridimensionales (3D) de estas estructuras complejas para estudiar cómo se forman los complejos replicativos, cómo se transfiere el genoma replicado a los sitios de ensamblaje y cómo nuevas partículas infecciosas se ensamblan y maduran en las factorías virales. En este trabajo revisamos las técnicas de ME que aportan información 3D de las células y cómo podemos aplicarlas para caracterizar la compleja organización de las factorías virales. Las reconstrucciones generadas a partir de cortes seriados y las réplicas metálicas de células procesadas mediante criofractura proporcionan mapas 3D de media resolución que planteamos usar como herramientas complementarias para ayudar a la interpretación de los mapas celulares de gran complejidad que se obtendrán por tomografía electrónica. En este contexto los virus nos están aportando modelos para comprender la arquitectura y las rutas de tráfico celular.

Keywords: 3DEM, oriented serial sectioning, metal replication, viral factories.

Introduction

The structure of infected cells is radically modified by many viruses. The formation of viral factories, a massive recruitment of organelles at the replication and assembly sites induced by viral factors [1], is perhaps the clearest example. Many different non-related viruses build factories in host cells. In our laboratory, *Bunyamwera* virus (BUNV) is one of the experimental models we use for studying viral factories. *Bunyamwera* virus, an arthropod borne virus (arbovirus) belonging to the *Bunyaviridae* family (*Orthobunyavirus* Genus), is transmitted by mosquitoes (usually from the *Aedes* Genus) as do other arboviruses. Some of those arboviruses cause serious diseases in humans, such as meningitis, encephalitis or hemorrhagic fever [2], like for example *La-Crosse* virus in the U.S.A

[3] or *Oropouche* virus in Brazil [4]. These viruses are gaining more sanitary importance and have been catalogued as emergent or re-emergent disease agents [5]. Human activities and climate change have been described as major causes of the spreading of these viruses [6]. *Bunyamwera* virus factory is visualized as a recruitment of mitochondria and endoplasmic reticulum elements around the Golgi apparatus [1] where virus assembly occurs [7]. In this cell-viral hybrid compartment, many interactions are necessary for the construction of macromolecular structures of viral origin, for example viral tubes [7], and for viral assembly and maturation along the Golgi stack [8]. Our long term aim is to obtain 3D reconstructions of these viral factories with enough resolution to build their molecular maps. This ambitious project will have to be accompanied by technical developments such as the implementation of ET for large regions of eukaryotic cells [9]. In this work we describe how to generate useful three-dimensional information to assist in the interpretation of the very complex maps of cells to be obtained by ET. This is possible thanks to the study of oriented sections, 3D reconstruction of serial

sections and analysis of metal replicas of freeze fractured cells followed by transmission electron microscopy (TEM). With these techniques we are studying viral factory dynamics and how cells maintain and modify their architecture.

Oriented sectioning of cellular monolayers.

Cultured cells grown in monolayers represent the basic model system for the characterization of many viruses. The standard procedure for thin-sectioning of these samples starts with a fixation *in situ* followed by removal of the cells to prepare a pellet. After embedding in a resin, cells inside the pellet are randomly oriented in all directions [10]. In thin-sections from these samples, a global understanding of cell content is difficult, and detection of scarce or non-randomly distributed elements could be rather difficult. Moreover, viral factories and their internal elements are not randomly distributed inside infected cells. To avoid these limitations, we have implemented the oriented sectioning technique. The principle is simple: if we cut a group of cells with the same orientation with respect to their physical support, we will be able to cover all planes of all cells in the monolayer in an oriented manner. The protocol we use is as follows: Monolayers of cultured cells are grown on Thermanox[®] plastic support (Nunc) (Figure 1A and B). Cells infected with BUNV are fixed at different times post-infection with 1% glutaraldehyde and 0.5% tannic acid, during 1 h at room temperature (RT), and washed two times in HEPES buffer. The cellular monolayer on the plastic support is very delicate and Thermanox[®] sheets have to be picked up and manipulated quite carefully. Therefore, in all the subsequent steps, cells are washed or incubated by transferring the monolayers on Thermanox[®] between eppendorfs containing the next solution (instead of emptying and refilling the same eppendorf).

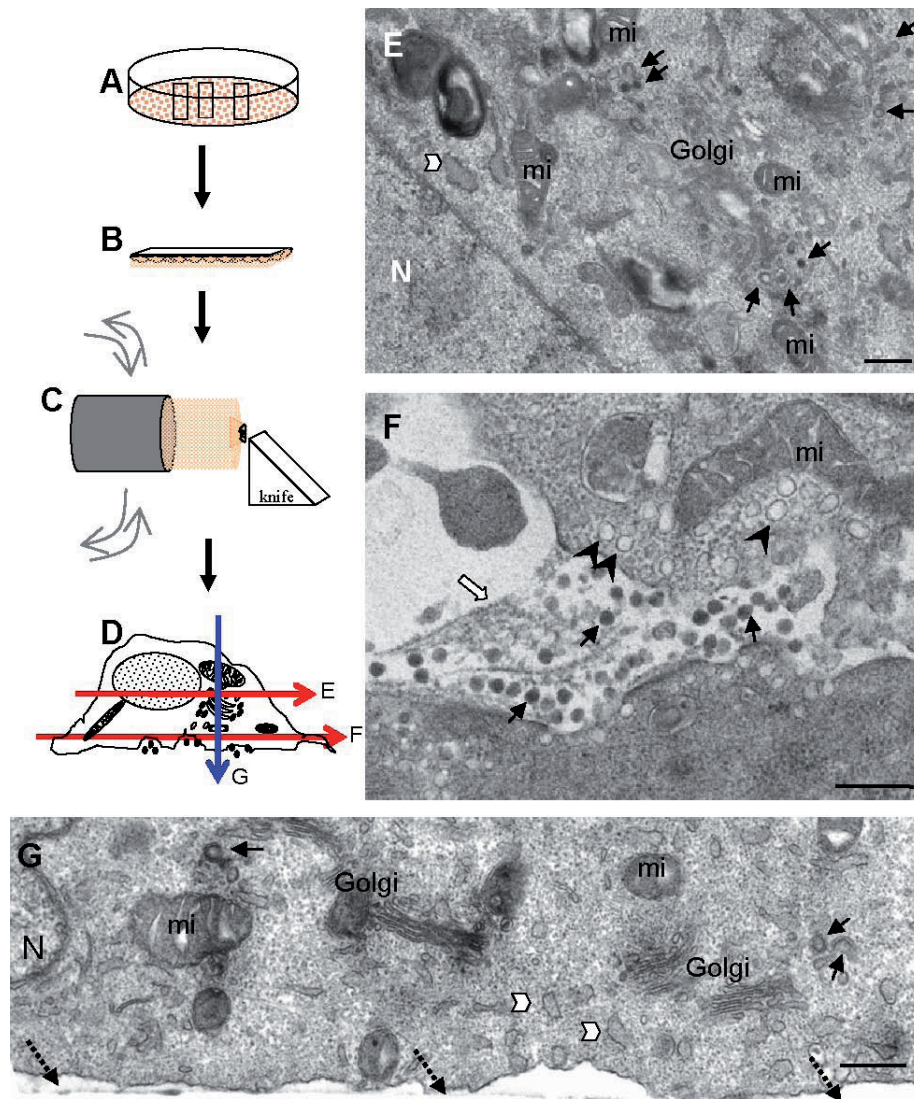


Figure 1: Oriented sectioning of cell monolayers. A-D: Scheme showing the procedure to obtain oriented sections. A: Confluent cultured cells growing on pieces of Thermanox[®]. B: Cells on a plastic piece after embedding in an epoxy resin. C: Cell monolayer is glued on a resin capsule and mounted on the ultramicrotome unit where a trapezoid is trimmed. D: Starting at base-level and moving towards the apical zone of the cells, the serial sections are collected on grids, stained with uranyl acetate and lead citrate, and analysed by TEM. E-F: Micrographs of sections oriented in parallel to the base of the cell. E: Micrograph of an area of an oriented section in the “middle” of the cell (3µm). A BUNV factory containing numerous viral assemblies (arrows) can be seen in Golgi membranes near the nucleus (N). Mitochondria (mi) and rough endoplasmic reticulum (white arrowhead) surround the factory. F: Micrograph of a section cut very close to the base of the cells, where released virions (black arrows), caveolae (arrowheads) and elements of the cortical cytoskeleton (white arrow) can be seen. G: Elements of the factory as visualized in a section perpendicular to the base of the cell. Discontinuous arrows point to the plastic base. Bars: 300 nm.

Post-fixation is done by incubating the monolayers for 1h at 4°C in 1% osmium tetroxide and 0.8% potassium ferricyanide to fix and stain cell lipids and then washed two times in HEPES (pH 7.4). Cells are then treated 40 min at 4°C with 2% uranyl acetate, which protects membranes from extraction during dehydration. After that we apply short dehydration steps in increasing concentrations of acetone (50, 70, 90 and 100%, 10min each, at 4°C) to minimize the extraction of soluble components. Finally, the monolayer is processed by embedding in the epoxy resin EML-812 (Taab Laboratories, Adermaston, Berkshire, UK) as previously described [11] but using a flat embedding mold (Ted Pella, Inc.) instead of regular capsules. Once embedded, the monolayer has to be physically adapted to the ultramicrotome unit. This can be done by mounting the monolayer on an epoxy resin capsule with standard glue for plastic material (Figure 1A to D). Basically, the monolayer can be oriented in two main ways: to obtain sections in planes parallel to the base of the cells (Figure 1E and 1F) or perpendicular to the cell base (Figure 1G). Oriented sections are showing new aspects on BUNV factory organization inside cells. Different viral assemblies concentrate in distinct planes of the cell: viral tubes and immature viruses are mainly located at 3–6 μm from the cell base (Figure 1E) while infectious virions are massively released from the cell basal zone (Figure 1F). Another important advantage of this oriented sectioning is that images of particular structures visualized by EM can be correlated adequately with the images obtained by confocal microscopy.

Serial Sections.

As a first approach for 3D analysis of cells at the EM level, we have incorporated a method for serial section reconstruction: a series of consecutive sections of cells embedded in an epoxy resin are obtained, imaged and processed to model a low resolution 3D map of the specimen of interest. The voxel size achieved by this

technique can have an anisotropic resolution of about 4 nm in XY axis and 50 nm in Z axis [Fontana J., López-Montero N., Elliott R.M., Fernández J.J. and Risco C., unpublished results]. This resolution is enough for learning about contacts between different elements like synapses between neurons [12], or for getting specific information about spatial distribution of small elements [13]. In our laboratory we have optimized the protocol of serial section reconstruction for studying contacts between different organelles in viral factories. To this end, the sample is chemically fixed with a mixture of 1% glutaraldehyde and 0.5% tannic acid in HEPES buffer (pH 7.4) for 30 min at room temperature and embedded in an epoxy resin as previously described [14]. Ultrathin consecutive sections about 50 nm thick are collected on Formvar-coated parallel-bar copper grids with a perfect-loop (Diatome) and stained 30 min with saturated aqueous uranyl acetate and 2 min with lead citrate. To obtain long ribbons it is important to improve the adhesion between two consecutive sections. In addition, this will facilitate collection of the sections [15]. To this purpose, the quality of trimming is critical. Small trapezoids with parallel upper and lower sides and large bases represent the most adequate shape for the pyramid top. It is important to pick-up the sections in parallel to the bars of the grid, allowing the same regions to be seen all over the series (Figure 2A). Detailed protocols about how to solve problems while serial sectioning can be found in reference [15]. Slot grids can help when very long series are required, although they require a careful manipulation [16]. Samples are then studied by TEM. It is important to start studying a central section of the series, because when an interesting region is found, it can be easily followed up and down the ribbon. After selecting and photographing the region of interest in all sections, the photographs are digitalized (Figure 2B) and normalized using the Bsoft software [17]. This normalization allows to compare all the micrographs of the series by giving the same mean and standard

deviation to all of them. The sections are aligned by selecting common spots (Figure 2C to E) between two consecutive sections using the free editor for serial section microscopy “Reconstruct” [18] (<http://synapses.bu.edu/tools/index.htm>), following the “tips for aligning sections” of the User’s manual. These include selecting traces all over the micrograph, ideally at least one in each corner of the micrograph and another one in the middle. To minimize distortions of the final volume it is important to avoid the selection of the same trace in consecutive pairs of sections. Reconstruct takes

into account the potential deformations associated to the sectioning process or to irradiation in the electron microscope. The main difference between our studies and previously reported works on serial section reconstruction is in the segmentation procedure, that is, the assignment of identity to the different elements of the micrographs. In our studies we have employed the knowledge previously developed for electron tomography reconstruction instead of manual drawing of the elements to be reconstructed [19].

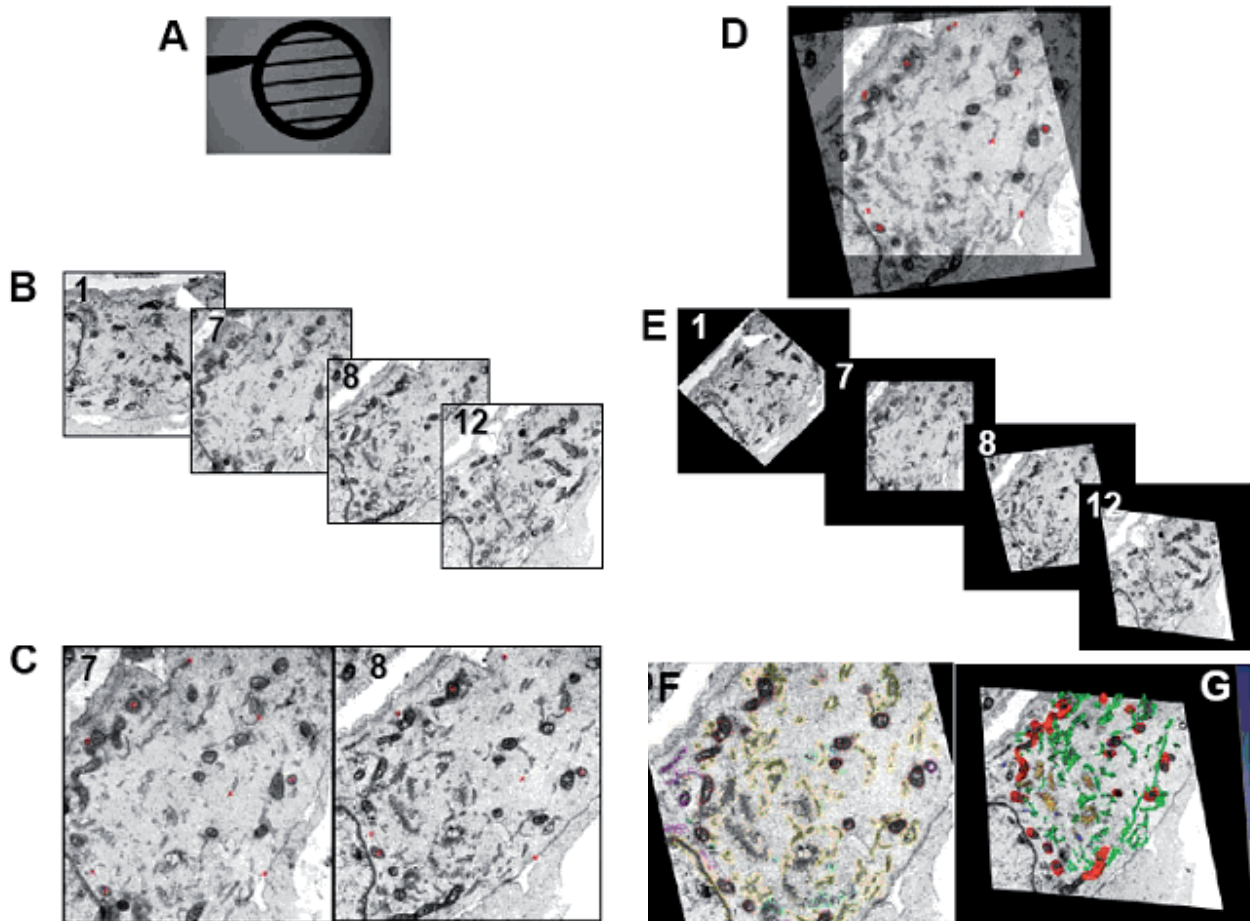


Figure 2. Serial Section Reconstruction. (A) Formvar coated parallel-bar copper grid with consecutive sections. (B) Four scanned micrographs of a selected zone out of a series of 15 sections. Note that the micrographs are not aligned. (C) Selection of common spots (red points) between two consecutive sections using Reconstruct software. (D) Two aligned consecutive sections. (E) The four micrographs shown in B after the alignment process. (F) Segmentation is done by selecting a mask that encloses the different elements of the factory using Amira software. (G) The quantity of material to be represented in the final 3D model is calculated for the different elements and color code for the final 3D map is established.

We have drawn a mask around each different material using Amira (<http://amira.zib.de>) (Figure 2F). This mask is just a selection of the pixels to be included in the calculations that will render the final 3D model. When the mask is being drawn it is important to assure the selection of all the pixels of a particular material by including pixels of the surrounding area as well. Noise reduction is then performed by applying three iterations of a median filter [20]. The optimal threshold, that is the quantity of material previously selected with the mask to be included in the 3D model, is calculated for the different materials by using a previously implemented

algorithm [21]. Thus, 3D reconstructions (Figure 2G and Figure 3) do not exclusively depend on the manual drawing of the limits of the different elements and higher resolution is obtained. However, the intrinsic problem of serial sections which is the poor resolution in the Z axis, is still present. A possibility for minimizing this limitation would be using thinner sections. In Figure 3 we can observe the details provided by these 3D maps. Contacts between the different structures included in the reconstructions are clearly seen. A careful study of these volumes will help us to understand how viral factories are built and work inside infected cells.

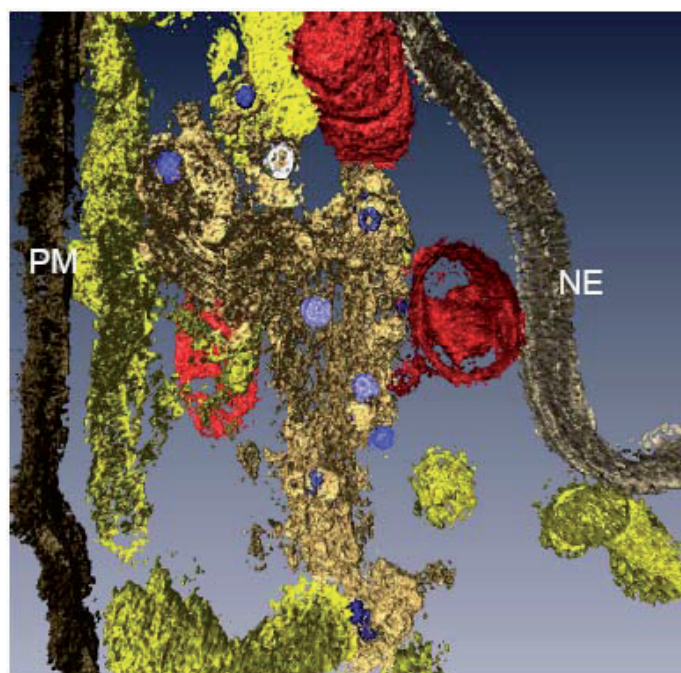


Figure 3. Serial section 3D reconstruction of a BUNV infected cell. New viral particles (purple) and viral tubes (white) are seen inside Golgi stacks (beige) surrounded by mitochondria (red) and RER elements (yellow). NE Nuclear Envelope. PM Plasma Membrane.

Freeze-fracture and metal replication.

Metal replicas can also provide 3D information of cells at medium resolution [22]. This technique consists in making a metal replica of the cell surface or the intracellular structures for their posterior study by TEM. When combined with labelling procedures for specific

molecules with antibodies tagged with colloidal gold, replicas of the cell surface can provide valuable information about the distribution of receptors [23]. It also allows the study of the interior of the cell if previously fractured (Figure 4). For the standard freeze-fracture procedure, a suspension of cells fixed with 0.1%

glutaraldehyde and cryoprotected with glycerol are fast-frozen in liquid ethane or propane and then fractured inside a freeze-fracture unit at -150°C [24]. Freeze-fracture of infected cells offers a global view of the whole viral factory (Figure 4A). Changes in the general distribution of organelles during factory construction are appreciated: Golgi stacks and mitochondria form a large structure near the nucleus. This recruitment leaves peripheral areas of the cell mostly empty of organelles, aspect that is also observed in thin-sections (Figure 4B). Although the global view is similar both with thin-sections and freeze-fracture, the three-dimensionality offered by metal replicas of freeze-fractured cells provides additional details when studying small elements at higher magnification. An example of this is observed when looking for small tubular structures of viral origin that assemble in Golgi stacks [7]. Thin sections show these elements as cylindrical structures with a larger globular domain in one of the extremes (Figure 4C). Although thin-sections show these tubes in Golgi areas and apparently associated to Golgi membranes, freeze-fracture provides evidences of their spatial integration in Golgi stacks (Figures 4D and 4E). Globular heads are integrated in Golgi sacculi, frequently on the periphery of the stack and always surrounded by membranes of this organelle (Figure 4D). The cylindrical domain of tubes is also inserted in the Golgi structure, sometimes connecting two contiguous stacks (Figure 4E). Both surface replication and freeze-fracture can be combined with an etching step at -90°C . Water molecules of the upper layer of the exposed structure are removed from the sample with the help of a cold trap, for example the knife used for fracturing. As the chamber is under high-vacuum, the water of the sample goes to the cold trap. Etching unmaskes the molecules of the upper layer of the sample, exposing them for replication. If the replicas are done with metals of fine grain, such as tantalum,

resolution increases considerably. This suggests that replicas can be used to assist in segmentation of complex volumes obtained by electron tomography [22]. Direct 3D views of cell structures can be obtained by tilting the replicas in the electron microscope and making stereo pairs [22].

Concluding remarks.

The study of cell organization with enough resolution to characterize macromolecular interactions is nowadays a big challenge for structural biologists. ET has become the method of reference to obtain 3D maps of large, complex structures such as organelles and cell regions [25–29]. Advances in sample processing by high-pressure freezing and cryosectioning are providing native material for the elaboration of 3D maps of cells with molecular resolution. These maps are going to be of a considerable complexity. The application of immunogold labelling methods and the elaboration of complementary 3D maps of the same cell structures by serial section reconstruction and metal replication will help us to perform a more accurate segmentation and interpretation of tomograms [30]. Within this context we are studying viral infection as a model because inside infected cells there is a massive production of a few classes of viral macromolecular complexes. This will facilitate the development of methods to follow small structures and to study macromolecular interactions within the very complex intracellular environment.

Acknowledgements

This work was supported by grants BMC2003-01630 and BFU2006-04584/BMC from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (to C.Risco). Juan Fontana and Noelia López-Montero are recipients of contracts from the Comunidad de Madrid.

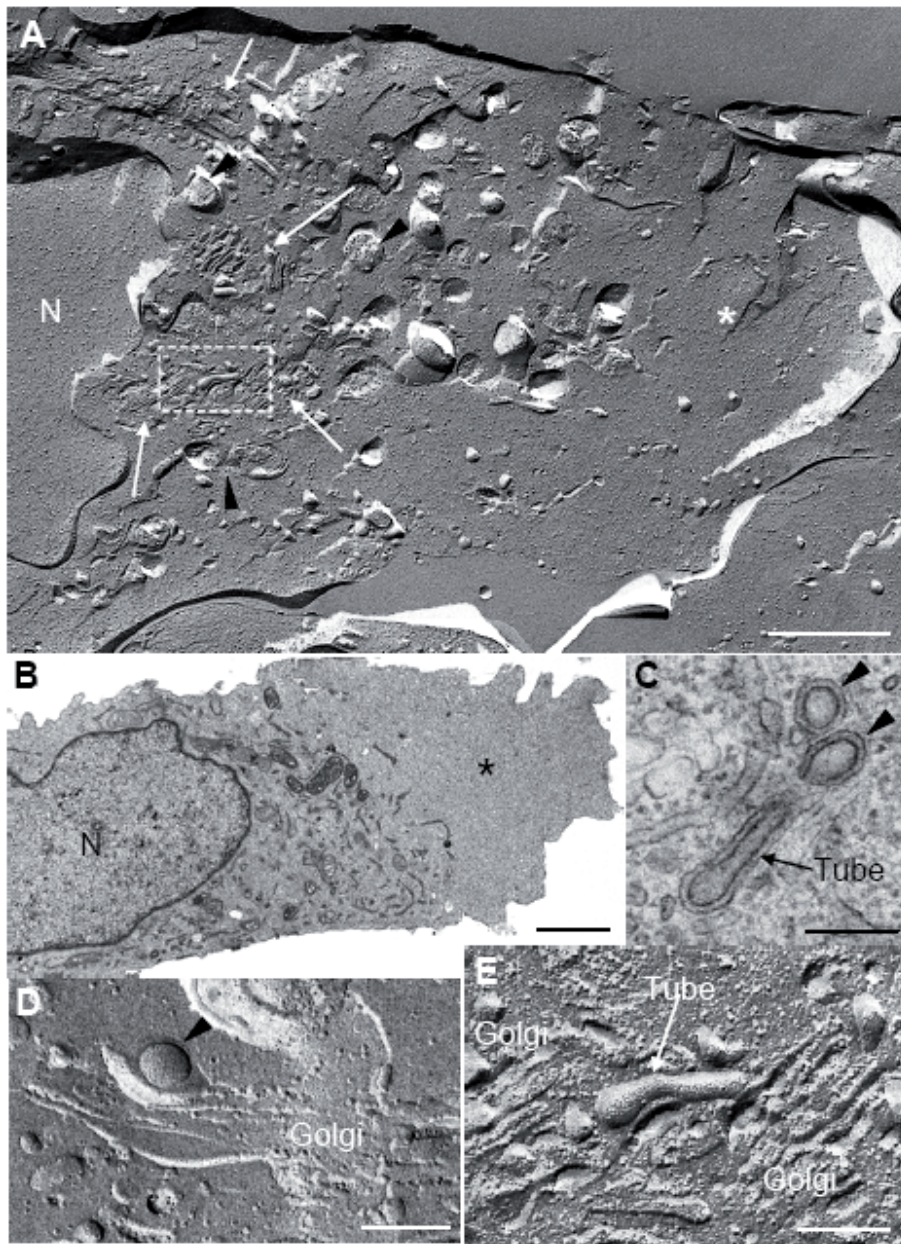


Figure 4. Freeze-fracture and metal replication to study virus factories. (A) Platinum/carbon replica of BHK-21 cells infected with Bunyamwera virus (BUNV) and processed by freeze-fracture in a BAF 060 unit (BAL-TEC, Liechtenstein). White arrows point to Golgi stacks while arrowheads point to recruited mitochondria. The white asterisk is on the peripheral region of the cell where organelles are missing. (B) Thin-section of a similar infected cell showing the recruitment of organelles to the perinuclear region and the empty periphery (black asterisk). (C) Thin section showing viral tubes and their globular domains (arrowheads) as seen when studying the Golgi stacks of the virus factory at higher magnification. (D) Freeze-fracture clearly shows that the globular domains (arrowhead) are always inside swollen Golgi sacculi. (E) Higher magnification of the factory area marked with a white rectangle in (A). A viral tube is seen as a “link” between two contiguous Golgi stacks, something difficult to appreciate in thin-sections. N: nucleus.

Bars: 1 μ m in A and B; 200 nm in C-E.

References

- [1] Novoa R.R., Calderita G., Arranz R., Fontana J., Granzow H., Risco C. (2005) “Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis” *Biol Cell* 97(2):147-172.
- [2] Stuart T.N. (2001) *Fields Virology*, U.S.A, Lippincott Williams and Wilkins, pp. 1603-1634.
- [3] Borucki M.K., Kempf B.J., Blitvich B.J., Blair C.D., Beaty B.J. (2002) “La Crosse virus: replication in vertebrate and invertebrate hosts” *Microbes Infect* 4(3):341-50.
- [4] Figueiredo, L.T. (2007) “Emergent arboviruses in Brazil” *Rev Soc Bras Med Trop* 40(2):224-9.
- [5] Elliott RM (1997) “Emerging viruses: the Bunyaviridae” *Mol Med* 3(9):572-577.
- [6] Tatem A.J., Hay S.I., Rogers D.J. (2006) “Global traffic and disease vector dispersal” *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(16):6242-6247.
- [7] Salanueva I.J., Novoa R.R., Cabezas P., Lopez-Iglesias C., Carrascosa J.L., Elliott R.M., Risco C. (2003) “Polymorphism and structural maturation of bunyamwera virus in Golgi and post-Golgi compartments” *J Virol*. 77(2):1368-1381.
- [8] Novoa R.R., Calderita G., Cabezas P., Elliott R.M., Risco C. (2005) “Key Golgi factors for structural and functional maturation of bunyamwera virus” *J Virol* 79(17):10852-10863.
- [9] Koning R.I., Zovko S., Barcena M., Oostergetel G.T., Koerten H.K., Galjart N., Koster A.J., Mieke Mommaas A. (2007) “Cryo electron tomography of vitrified fibroblasts: Microtubule plus ends in situ” *J Struct Bio*. doi:10.1016/j.jsb.2007.08.011.
- [10] Salanueva I.J., Carrascosa J.L., Risco C. (1999) “Structural maturation of the transmissible gastroenteritis coronavirus” *J Virol* 73(10):7952-7964.
- [11] Risco C., Muntión M., Enjuanes L., Carrascosa J.L. (1998) “Two types of virus-related particles are found during transmissible gastroenteritis virus morphogenesis” *J Virol* 72(5):4022-31.
- [12] Knott G.W., Holtmaat A., Wilbrecht L., Welker E., Svoboda K. (2006) “Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo” *Nat Neurosci*. 9(9):1117-1124.
- [13] Noda T., Sagara H., Yen A., Takada A., Kida H., Cheng R.H., Kawaoka Y. (2006) “Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles” *Nature* 26;439(7075):490-492.
- [14] Fontana J., Tzeng W.P., Calderita G., Fraile-Ramos A., Frey T.K., Risco C. (2007) “Novel replication complex architecture in rubella replicon transfected cells” *Cell Microbiol* 9: 875-890
- [15] Harris K.M., Perry E., Bourne J., Feinberg M., Ostroff L., Hurlburt J. (2006) “Uniform serial sectioning for transmission electron microscopy” *J Neurosci*. 22;26(47):12101-12103.
- [16] Hoog J.L., Antony C. (2007) “Whole-cell investigation of microtubule cytoskeleton architecture by electron tomography” *Methods Cell Biol* 79:145-167.
- [17] Heymann J.B., Belnap D.M. (2007) “Bsoft: Image processing and molecular modeling for electron microscopy” *J Struct Biol* 157: 3-18
- [18] Fiala J.C. (2005) “Reconstruct: a free editor for serial section microscopy” *J Micros* 218: 52-61.
- [19] Hoffpauir B.K., Pope B.A., Spirou G.A. (2007) “Serial sectioning and electron microscopy of large tissue volumes for 3D analysis and reconstruction: a case study of the calyx of Held” *Nat Protoc* 2(1):9-22.
- [20] van der Heide P., Xu X.P., Marsh B.J., Hanein D., Volkmann N. (2007) “Efficient automatic noise reduction of electron tomographic reconstructions based on iterative median filtering” *J Struct Biol* 158: 196-204

- [21] Cyrklaff M., Risco C., Fernández J.J., Jiménez M.V., Esteban M., Baumeister W., Carrascosa J.L. (2005) “Cryo-electron tomography of vaccinia virus” *Proc Natl Acad Sc USA* 102: 2772-2777.
- [22] Cabezas P., Risco C. (2006) “Studying cellular architecture in three dimensions with improved resolution: Ta replicas revisited” *Cell Biol Int.* 30(9):747, 754.
- [23] Schamel W.W., Arechaga I., Risueno RM., van Santen HM., Cabezas P., Risco C., Valpuesta J.M., Alarcon B. (2005) “Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity and wide range of response” *J Exp Med* 202(4):493-503.
- [24] Risco C., Rodriguez J.R., Lopez-Iglesias C., Carrascosa J.L., Esteban M., Rodriguez D. (2002) “Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment membranes and vimentin filaments participate in vaccinia virus assembly” *J Virol* 76(4):1839-1855.
- [25] Sali A., Glaeser R., Earnest T., Baumeister W. (2003) “From words to literature in structural proteomics” *Nature* 422(6928):216-225.
- [26] Subramaniam S. (2005) “Bridging the imaging gap: visualizing subcellular architecture with electron tomography” *Curr Opin Microbiol* 8(3):316-322.
- [27] Lucic V., Forster F., Baumeister W. (2005) “Structural studies by electron tomography: from cells to molecules”. *Annu Rev Biochem* 74:833-865.
- [28] Austin J.R. 2nd, Frost E., Vidi P.A., Kessler F., Staehelin L.A. (2006) “Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes” *Plant Cell* 18(7):1693-1703.
- [29] Bouchet-Marquis C., Zuber B., Glynn A.M., Eltsov M., Grabenbauer M., Goldie K.N., Thomas D., Frangakis A.S., Dubochet J., Chretien D. (2007) “Visualization of cell microtubules in their native state” *Biol Cell* 99(1):4553
- [30] McEwen B.F., Marko M. (2001) “The emergence of electron tomography as an important tool for investigating cellular ultrastructure” *J Histochem Cytochem* 49(5):553-564.